

Uniwersytet Warszawski
Wydział Biologii



Olga Bemowska-Kałabun
Nr albumu: 266640

Fenotypowe i genetyczne badania zmian mikroewolucyjnych w populacjach *Geranium robertianum* (Geraniaceae)

Rozprawa doktorska
w zakresie nauk biologicznych
dyscyplinie: biologii

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Małgorzaty Wierzbickiej
Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

Promotor pomocniczy
Dr Paweł Wąsowicz
Islandzki Instytut Historii Naturalnej
(*Icelandic Institute of Natural History*)

Warszawa, lipiec 2018

Oświadczenie kierującego pracą

Oświadczam, że niniejsza praca została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia doktora nauk biologicznych w zakresie biologii.

Data

Podpis kierującego pracą

Oświadczenie autora pracy

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została napisana przeze mnie samodzielnie i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.

Oświadczam również, że przedstawiona praca nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia doktora w innej jednostce.

Oświadczam ponadto, że niniejsza wersja pracy jest identyczna z załączoną wersją elektroniczną.

Data

Podpis autora pracy

Słowa kluczowe

Geranium robertianum L.; populacje torowe; populacje leśne; zróżnicowanie fenotypowe; zróżnicowanie genetyczne; mikroewolucja

Tytuł pracy w języku angielskim

The phenotypic and genetic study on the microevolutionary change in populations of *Geranium robertianum* (Geraniaceae)

**Badania wykonane w ramach niniejszej pracy zostały sfinansowane
ze środków na naukę w ramach następujących projektów badawczych:**

- Grant Narodowego Centrum Nauki – Opus, nr 2011/03/B/NZ8/03044: „Fenotypowe i genetyczne badania zmian mikroewolucyjnych w populacjach *Geranium robertianum* (Geraniaceae)”. Kierownik projektu: Prof. dr hab. Małgorzata Wierzbicka.
- DSM 2014: pt. „Działanie herbicydu Roundup na torowiskową populację *Geranium robertianum* L.”. Kierownik projektu: Mgr Olga Bemowska-Kałabun.
- DSM 2015: pt. „*Geranium robertianum* na torach kolejowych – Kwitnienie i regeneracja liści u *Geranium robertianum* L. po działaniu herbicydem Roundup”. Kierownik projektu: Mgr Olga Bemowska-Kałabun.
- Grantu Narodowego Centrum Nauki – Preludium, nr 2015/19/N/NZ8/00184: „Procesy zachodzące w siedliskach zmienionych antropogenicznie - herbicyd Roundup na torach kolejowych i skutki jego stosowania dla roślin *Geranium robertianum*”. Kierownik projektu: Mgr Olga Bemowska-Kałabun.

PODZIĘKOWANIA

Serdeczne podziękowania za opiekę, życzliwość, optymizm oraz za nieocenioną pomoc w trakcie realizacji niniejszej pracy doktorskiej chciałam złożyć prof. dr hab. Małgorzacie Wierzbickiej. Gorące podziękowania składam także dr Pawłowi Wąsowiczowi za poświęcony czas oraz okazaną pomoc.

Ponadto szczególne podziękowania kieruję do:

- *Dr Łukasza Napory-Rutkowskiego z Zakładu Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej Państwowej Akademii Nauk w Gołyszach oraz dr Zuzanny Nowak z Katedry Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie – za pomoc udzieloną w trakcie badań genetycznych;*
- *Dr Agnieszki Abratowskiej z Pracowni Ekotoksykologii Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego oraz Zespołu Laboratorium Mikroskopii Elektronowej, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Państwowej Akademii Nauk w Warszawie – za wprawcie udzielone w trakcie badań z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej;*
- *Mgr Karola Torzewskiego z Katedry Ekologii, Biogeochemii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Wrocławskiego – za pomoc udzieloną na początku badań terenowych;*
- *Dyrekcji Kampinoskiego Parku Narodowego – za zgodę na pobranie materiału do badań.*

Dziękuję także studentom, absolwentom, nauczycielom, współpracownikom, a także przyjaciółom z Pracowni Ekotoksykologii oraz innych Zakładów Wydziału Biologii Uniwersytetu Warszawskiego za wspianą atmosferę oraz udzielone wsparcie:

- *Dr Dorocie Panufnik-Mędrzyckiej, mgr Krzysztofowi Brzostowi, prof. dr hab. Mieczysławowi Kurasiowi, Jarosławowi Kurasiowi, dr Magdalenie Michalskiej-Kacymirow, dr Piotrowi Zaniewskiemu, mgr Wandzie Cegielkowskiej, mgr Karolinie Bodzon;*
- *Dr Julicie Nowakowskiej z Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej, prof. dr hab. Elżbiecie Romanowskiej wraz z Zespołem Zakładu Molekularnej Fizjologii Roślin, dr hab. Bożenie Szal i dr Monice Ostaszewskiej-Bugajskiej wraz z Zespołem Zakładu Anatomii i Cytologii Roślin, prof. dr hab. Barbarze Sudnik-Wójcikowskiej wraz z Zespołem Zakładu Ekologii Roślin i Ochrony Środowiska;*
- *Annie Zawadzkiej, Agnieszce Boguckiej, Katarzynie Idzikiewicz, Agnieszce Ignasik, Zuzannie Tarnawskiej, mgr Aleksandrze Napiętko, mgr Katarzynie Krawczak oraz wielu innym.*

Na koniec pragnę podziękować najbliższym przyjaciółom oraz całej mojej Rodzinie, szczególnie mojemu mężowi Mateuszowi i rodzicom Alicji i Waldemarowi za wiarę we mnie oraz ogromne wsparcie.

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI	I
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	IV
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	VI
I. WSTĘP	1
I.1. MIKROEWOLUCJA I POWSTAWANIE NOWYCH FORM ROŚLIN NA TERENACH ANTROPOGENICZNIE ZMIENIONYCH	1
I.2. TORY KOLEJOWE – „POLIGON BADAWCZY” DO BADANIA PROCESÓW MIKROEWOLUCYJNYCH.....	3
I.3. GŁÓWNE ZANIECZYSZCZENIA NA TORACH KOLEJOWYCH	3
I.3.1. METALE CIĘŻKIE	3
I.3.2. WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE	5
I.3.3. POLICHLOROWANE BIFENYLE	6
I.3.4. SUBSTANCJE ROPOPOCHODNE	7
I.3.5. HERBICYDY	8
I.4. SKUTKI STOSOWANIA HERBICYDÓW NA TORACH KOLEJOWYCH	10
I.4.1. HERBICYD ROUNDUP I JEGO SUBSTANCJA CZYNNA – GLIFOSAT	10
I.5. ROŚLINNOŚĆ WYSTĘPUJĄCA NA TORACH KOLEJOWYCH.....	12
I.6. BIOLOGIA I EKOLOGIA <i>GERANIUM ROBERTIANUM</i> L.....	13
I.7. EKOLOGIA MOLEKULARNA.....	15
I.7.1. MARKERY MOLEKULARNE.....	17
I.7.2. AFLP – POLIMORFIZM DŁUGOŚCI AMPLIFIKOWANYCH FRAGMENTÓW	18
II. CELE PRACY.....	20
III. MATERIAŁY I METODY	21
III.1. OBIEKT BADAŃ I MIEJSCE BADAŃ	21
III.2. PRACE TERENOWE.....	22
III.2.1. BADANIA BIOMETRYCZNE ROŚLIN WYKONANE W TERENIE	22
III.2.2. POMIARY NATĘŻENIA ŚWIATŁA W TERENIE.....	24
III.3. BADANIA ROŚLIN WYHODOWANYCH W SZKLARNI.....	25
III.3.1. TESTY KIEŁKOWANIA NASION	25
III.3.2. HODOWLA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	25
III.3.3. BADANIA BIOMETRYCZNE ROŚLIN WYHODOWANYCH W SZKLARNI.....	27
III.3.4. POMIAR NATĘŻENIA ŚWIATŁA W SZKLARNI.....	29
III.3.5. POMIARY ZAWARTOŚCI ANTOCYJANÓW W ROŚLINACH <i>G. ROBERTIANUM</i>	29
III.3.6. TOLERANCJA NA SUSZĘ ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	30
III.3.7. WPLYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY <i>G. ROBERTIANUM</i>	30
III.3.7.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW HERBICYDU ROUNDUP	30
III.3.7.2. PRZEPROWADZONE OBSERWACJE.....	31
III.3.7.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ W TEM	31
III.3.7.4. BADANIA WSTĘPNE NAD REAKCJĄ ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> NA HERBICYD.....	33
III.3.7.5. REAKCJA ROŚLIN Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH NA HERBICYD ROUNDUP	35

III.3.7.6. CHLOROZY NA LIŚCIACH ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	35
III.3.7.7. ZAWARTOŚĆ GLIFOSATU I AMPA W ROŚLINACH PO OPRYSKU HERBICYDEM.....	36
III.3.7.8. KWITNIENIE ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> PO OPRYSKU HERBICYDEM ROUNDUP	36
III.4. BIOLOGIA REPRODUKCJI ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	37
III.5. OPRACOWANIE WYNIKÓW, ANALIZY STATYSTYCZNE.....	38
III.6. BADANIA GENETYCZNE	38
III.6.1. POBÓR MATERIAŁU DO BADAŃ GENETYCZNYCH I POPULACJE <i>G. ROBERTIANUM</i> WYKORZYSTANE W BADANIACH	38
III.6.2. IZOLACJA DNA	40
III.6.3. METODA AFLP	40
III.6.3.1. TRAWIENIE DNA	41
III.6.3.2. LIGACJA ADAPTORÓW	41
III.6.3.3. PREAMPLIFIKACJA	42
III.6.3.4. SELEKTYWNA AMPLIFIKACJA.....	42
III.6.3.5. ELEKTROFOREZA KAPILARNA	43
III.6.3.6. ZASTOSOWANE PUNKTY KONTROLNE PRZY PROCEDURZE AFLP	43
III.6.4. METODY ANALIZY DANYCH GENETYCZNYCH.....	43
III.6.4.1. PODSTAWOWE PARAMETRY RÓŻNORODNOŚCI GENETYCZNEJ	44
III.6.4.2. STRUKTURA GENETYCZNA POPULACJI	44
III.6.4.3. ANALIZA WARIANCJI MOLEKULARNEJ (AMOVA)	45
IV. WYNIKI	46
IV.1. WARUNKI SIEDLISKOWE PANUJĄCE NA TORACH KOLEJOWYCH I W LASACH.....	46
IV.2. PORÓWNANIE ROŚLIN WYSTĘPUJĄCYCH NA TORACH KOLEJOWYCH I W LASACH.....	53
IV.3. PORÓWNANIE ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH WYHODOWANYCH W JEDNAKOWYCH WARUNKACH SIEDLISKOWYCH.....	60
IV.4. PORÓWNANIE POPULACJI TOROWYCH Z WALIĘ Z POPULACJAMI LEŚNYMI Z ZAJEŻIERC WYHODOWANYCH Z NASION ZEBRANYCH W RÓŻNYCH LATACH	72
IV.5. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY <i>G. ROBERTIANUM</i>	88
IV.5.1. BADANIA WSTĘPNE.....	88
IV.5.2. CHLOROZY NA LIŚCIACH	90
IV.5.3. PORÓWNANIE REAKCJI NA HERBICYD ROŚLIN Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH.....	91
IV.5.4. ZAWARTOŚĆ GLIFOSATU I AMPA W ROŚLINACH <i>G. ROBERTIANUM</i>	93
IV.5.5. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA KWITNIENIE ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	96
IV.6. BADANIA NAD BIOLOGIĄ REPRODUKCJI ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	98
IV.7. BADANIA GENETYCZNE ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH	99
IV.7.1. PODSTAWOWE PARAMETRY RÓŻNORODNOŚCI GENETYCZNEJ BADANYCH POPULACJI.....	99
IV.7.2. STRUKTURA GENETYCZNA BADANYCH POPULACJI	101
IV.7.3. ANALIZA WARIANCJI MOLEKULARNEJ (AMOVA) BADANYCH POPULACJI	108
IV.7.4. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> – PODSUMOWANIE	110
V. DYSKUSJA	111
V.1. WARUNKI ŻYCIA A ZMIENNOŚĆ MORFOLOGICZNA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> NA STANOWISKACH TERENOWYCH	111

V.2. ZMIENNOŚĆ MORFOLOGICZNA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH HODOWANYCH W JEDNAKOWYCH WARUNKACH	112
V.2.1. KIELKOWANIE NASION	112
V.2.2. PARAMETRY BIOMETRYCZNE	114
V.2.3. KOLOR BLASZEK LIŚCIOWYCH I ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW	115
V.3. CZYNNIKI STRESOWE DLA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	116
V.3.1. WPŁYW STRESU RADIACYJNEGO NA ROŚLINY <i>G. ROBERTIANUM</i>	117
V.3.2. WPŁYW SUSZY NA ROŚLINY <i>G. ROBERTIANUM</i>	119
V.3.3. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY <i>G. ROBERTIANUM</i>	120
V.3.4. PORÓWNANIE TOLERANCJI ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH NA HERBICYD ROUNDUP	123
V.4. BIOLOGIA REPRODUKCJI ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i>	128
V.5. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA ROŚLIN <i>G. ROBERTIANUM</i> Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH ORAZ ZACHODZENIE PROCESÓW EPIGENETYCZNYCH	129
VI. WNIOSKI	135
VII. LITERATURA	136
VIII. TABLICE	146

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

W dobie postępującego zanieczyszczenia środowiska szczególną rolę odgrywają procesy mikroewolucji roślin na siedliskach antropogenicznych, które z czasem mogą prowadzić do powstawania nowych form roślin. Silnie zmienione siedlisko, takie jak na przykład tory kolejowe, można potraktować jako „poligon badawczy”, który pozwoli prześledzić zachodzące tam procesy mikroewolucyjne.

W niniejszej pracy doktorskiej „poligonem badawczym” do badania procesów mikroewolucyjnych były właśnie tory kolejowe. Jednym z gatunków występujących na nasypach kolejowych w północno-wschodniej Polsce był gatunek *Geranium robertianum* L. Występowanie *G. robertianum* na silnie przekształconym siedlisku jakim są tory kolejowe jest niezwykle, gdyż jest to gatunek, który preferuje zacienione, wilgotne siedliska leśne o glebach bogatych w azot i fosfor. Tymczasem na torach kolejowych panują warunki silnego nasłonecznienia a podłożem jest tłuczeń wymieszany z piaskiem rzeczny. Jest to podłoże bardzo ubogie. W dodatku na nasypach kolejowych stosuje się regularnie oprysk herbicydami w celu usunięcia roślin.

Przeprowadzono badania nad roślinami *G. robertianum* z północno-wschodniej Polski występujących na torach kolejowych („populacje torowe”) i roślin występujących w lasach („populacje leśne”). Głównym celem badań było sprawdzenie jaka jest ranga taksonomiczna nowo odkrytej formy *G. robertianum* porastającej tory kolejowe w miejscowości Waliły-Stacja. Sprawdzano także jak wygląda zróżnicowanie fenotypowe i genetyczne populacji torowych i leśnych *G. robertianum*? Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie czy nowo odkryta forma *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym istotnie różni się od roślin z innych populacji tego gatunku? Kolejnym celem badań było sprawdzenie na czym polegają przystosowania roślin *G. robertianum* z populacji torowych do niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych, takich jak: insolacja, niedobór wody oraz stosowanie herbicydów. Zastanawiano się, co mogło być czynnikiem selekcyjnym, który spowodował wyodrębnienie się nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach-Stacji?

Cele badawcze zostały zrealizowane dzięki przebadaniu zróżnicowania fenotypowego i genotypowego populacji torowych i leśnych *G. robertianum*. W sumie przebadano 21 populacji *G. robertianum* występujących na torach kolejowych oraz 16 populacji występujących w lasach. W ramach przeprowadzonych badań morfologicznych i anatomiczno-cytologicznych wykazano dużą plastyczność fenotypową gatunku *G. robertianum*. Przeprowadzono także badania genetyczne roślin *G. robertianum* z wykorzystaniem metody AFLP, w ramach których wykazano, że badane populacje torowe i leśne nie były odrębne pod względem genetycznym.

Wśród przebadanych populacji torowych i leśnych najbardziej wyróżniała się populacja z Walił-Stacji. Badania pokazały, że na torach kolejowych w Waliłach-Stacji występowała odmienna forma roślin *G. robertianum*. Rośliny z tej populacji były mniejsze, miały dużo mniejsze i ciemniejsze blaszki liściowe niż rośliny z innych populacji. Wykazano, że rośliny z populacji torowej z Walił charakteryzował zwiększony poziom antocyjanów. W ramach badań wykazano także podwyższoną tolerancję roślin *G. robertianum* z populacji

torowej z Walił-Stacji na insolację, suszę i herbicyd Roundup. Wśród czynników selekcyjnych, które przyczyniły się do powstania odmiennej formy roślin *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach można wymienić zatem stres radiacyjny, niedobór wody oraz stres herbicydowy. Ostatecznie wykazano, że gatunek *G. robertianum* pomimo niekorzystnych warunków środowiskowych jest zdolny przetrwać na torach kolejowych.

Ponieważ w ramach badań, wykazano niską różnorodność genetyczną w obrębie badanych populacji *G. robertianum*, to rangę taksonomiczną roślin z populacji torowej z Walił-Stacji należy określić jako „forma”. Do kategorii forma zaliczane są osobniki rzadko występujące w populacjach danego gatunku, wyróżniające się od pozostałych osobników pojedynczymi cechami, zaś ich występowanie jest związane najczęściej jedynie z niewielkimi modyfikacjami genetycznymi. Badania pokazały, że nowa forma roślin *G. robertianum* z Walił-Stacji nie była trwała. Wykazano że, charakterystyczne cechy obserwowane u roślin z Walił zanikły na przestrzeni około 5 lat, prawdopodobnie na skutek zaniku niektórych z czynników stresowych: zmniejszonego użytkowania linii kolejowej i zaprzestania oprysków herbicydem rzadziej używanej stacji.

Nowa forma roślin *G. robertianum* z populacji torowej z Walił-Stacji, mogła powstać na skutek wystąpienia procesów natury epigenetycznej. Do powstania nowej formy roślin *G. robertianum* w Waliłach-Stacji przyczyniło się występowanie na torach kolejowych licznych czynników stresowych, takich jak: insolacja, niedobór wody i soli mineralnych, czy wreszcie oprysk herbicydami. Zmiany epigenetyczne mogły zwiększyć zmienność fenotypową u *G. robertianum* i przyspieszyć proces adaptacji tych roślin do niesprzyjających warunków.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej stanowią doskonały przykład zachodzenia początkowego etapu procesu mikroewolucji u roślin na obszarach antropogenicznie przekształconych.

STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

In the era of progressing environmental pollution, the microevolution processes in plants inhabiting anthropogenic areas play a crucial role, as they may eventually lead to the emergence of new forms of plants. A strongly modified habitat, such as railroad tracks, can be treated as “research field”, which will allow to trace the microevolutionary processes taking place there.

The “research field” of the study of microevolutionary processes for this doctoral dissertation were railroad tracks. Among the plants found in north-eastern Poland on railway embankments, the *Geranium robertianum* L. species stood out. Occurrence of *G. robertianum* on extremely modified habitat, such as railway tracks, is unusual because, it is the species that prefers shaded and moist forest habitats with a high content of phosphorus and nitrogen in the soil. Meanwhile, the railroad tracks are exposed to strong sunlight, whereas substrate consists of crushed stone mixed with river sand. It is a very nutrient-poor substrate. In addition, railway embankments are the areas where herbicides are used regularly due to removal of plants.

Research was carried out on *G. robertianum* from north-eastern Poland, occurring on railway tracks (“track populations”) and plants found in forests (“forest populations”). The main goal of the research was to check what is the taxonomic rank of the newly discovered form of *G. robertianum*, which is growing on the railway tracks in the village of Waliły-Station. It was also examined, what was the phenotypic and genetic variation of *G. robertianum* track and forest populations? An attempt was made to answer the question, whether the newly discovered form of *G. robertianum* from Waliły-Station is significantly different in genetic terms from plants from other populations of this species. Another goal of the research was to check what is the adaptation of *G. robertianum* plants from the track population to unfavorable environmental conditions prevailing on railway tracks, such as: insolation, water shortage and the use of herbicides. It was considered what could be a selection factor that caused the emergence of a new form of *G. robertianum* on railway tracks in Waliły-Station?

Research goals were fulfilled thanks to the study of the phenotypic and genotypic diversity of the *G. robertianum* track and forest populations. In total, 21 populations of *G. robertianum* occurring on railway tracks and 16 populations occurring in forests were examined. During the morphological and anatomical-cytological research a high plasticity phenotype of *G. robertianum* species was demonstrated. Genetic studies of *G. robertianum* plants were also carried out using the AFLP method, which showed that the studied track and forest populations were not genetically distinct.

Among the tested track and forest populations, the population from Waliły-Station stood out the most. Studies have shown that there was a different form of *G. robertianum* on railway tracks in Waliły-Station. Plants from this population were smaller, had much smaller and darker leaf blades than plants from other populations. It was shown that plants from the track population from Waliły were characterized by an increased level of anthocyanins. As part of the research, an increased resistance of *G. robertianum* plants from the track

population from Waliły-Station to insolation, drought and Roundup herbicide treatment was also demonstrated. Therefore, among the selection factors that contributed to the emergence of a different form of plants *G. robertianum* on railway tracks in Waliły, radiation stress, water shortage and herbicidal stress can be mentioned. Finally, it was shown that species *G. robertianum* despite adverse environmental conditions, it is able to survive on railway tracks.

Because of the low genetic diversity within the studied *G. robertianum* populations, the taxonomic rank of plants from the track population of Waliły-Station should be described as “form”. Forms include those rarely found in populations of a given species, distinguishable from other individuals with single traits, and their occurrence is usually associated only with minor genetic modifications. The research showed that the new form of *G. robertianum* from Waliły-Station was not permanent. It has been demonstrated that the characteristic traits observed in plants from Waliły disappeared within 5 years, probably due to the disappearance of some stress factors: reduced use of the railway line followed by stopped herbicide treatment of a less-used station.

A new form of *G. robertianum* plants from the track population of Waliły-Station, could have arisen as a result of the occurrence of epigenetic processes. The creation of a new form of *G. robertianum* plants in Waliły-Station was a result of numerous stress factors occurring on the railway tracks, such as: insolation, water and mineral salt deficiency, and finally spraying with herbicides. Epigenetic changes could increase the phenotypic variability in *G. robertianum* and accelerate the adaptation of these plants to adverse conditions.

The results obtained in the framework of this doctoral thesis are a perfect example of the initial stage of the process of microevolution in plants in anthropogenically transformed areas.

I. WSTĘP

I.1. MIKROEWOLUCJA I POWSTAWANIE NOWYCH FORM ROŚLIN NA TERENACH ANTROPOGENICZNIE ZMIENIONYCH

W dobie postępującego zanieczyszczenia środowiska szczególną rolę odgrywają procesy mikroewolucji roślin na siedliskach antropogenicznych, które z czasem mogą prowadzić do powstawania nowych form roślin.

Przez mikroewolucję rozumiemy ewolucję na poziomie populacji, która dotyczy zmian w czasie we frekwencji alleli w danej populacji. Zmiany te pojawiają się na skutek mutacji, selekcji naturalnej (dobór naturalny), dryfu genetycznego, czy przepływu genów. Mikroewolucja prowadzi do zmienności wewnątrzpopulacyjnej taksonu (BABST-KOSTECKA 2015; ERNST 2006; Freeland 2008; HENDRY, KINNISON 2001; WIERZBICKA, ROSTAŃSKI 2002). Najprościej rzecz ujmując, mikroewolucja to procesy polegające na różnicowaniu genetycznym wewnątrz populacji danego gatunku. Zaś nowe przystosowania o podłożu genetycznym są dziedziczne i zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia, a także reprodukcji, np. roślin w określonym środowisku.

Badanie procesów mikroewolucyjnych zachodzących w środowisku, w siedliskach antropogenicznie zmienionych, jest obecnie jednym z podstawowych zagadnień ekotoksykologii. Wytworzenie podwyższonej tolerancji roślin na metale ciężkie jest modelowym procesem wykorzystywanym w badaniach nad ewolucją adaptacji do skrajnie niekorzystnych środowisk (FIG. 1). Tolerancja ta wyewoluowała niezależnie u różnych gatunków roślin, w wyniku procesów mikroewolucyjnych, działających na osobniki z sąsiednich populacji nie-metalolubnych. Na skutek działania czynnika szkodliwego następuje selekcja osobników i premiowanie tych o efektywnych możliwościach obronnych (np. posiadających zdolność do detoksyfikowania metali). Efektem zachodzenia procesów mikroewolucyjnych jest zatem wytworzenie tolerancji indukowanej (wzmocnionej) (ERNST 2006; WIERZBICKA 1999, 2015).

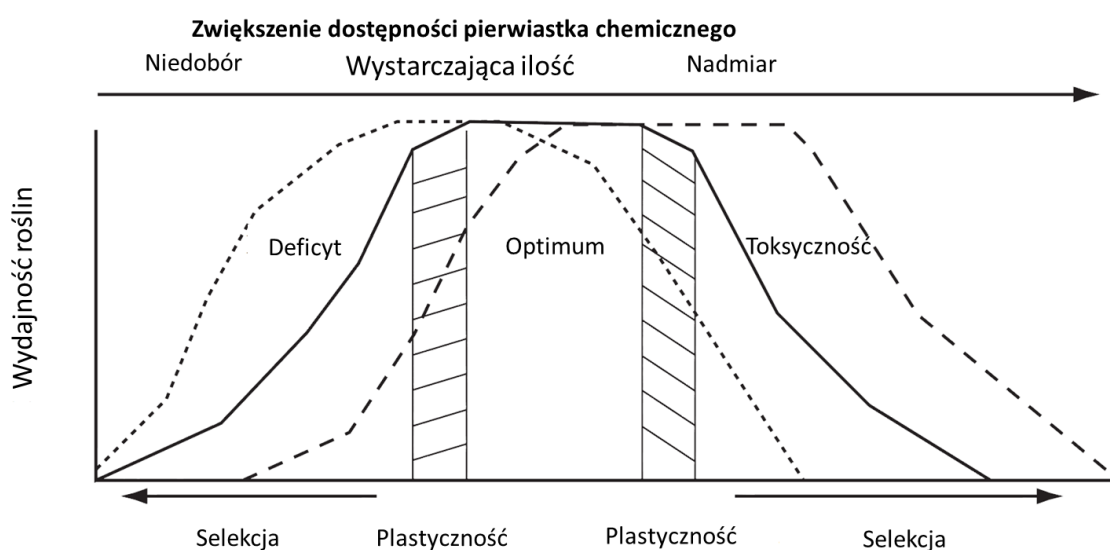


FIGURA 1. Schemat przedstawia kierunek ewolucji w zależności od wystąpienia deficytu lub nadmiaru pierwiastka chemicznego w środowisku (ERNST 2006).

Na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi takimi, jak hałdy cynkowo ołowiowe, występuje wiele metalofitów, np.: *Dianthus carthusianorum*, *Biscutella laevigata*, *Armeria maritima*, *Silene vulgaris*, *Viola guestphalica*, *V. calaminaria*, *V. reichenbachiana*, *V. riviniana*, czy wreszcie *Arabidopsis arenosa*. Gatunki te mają szereg przystosowań pozwalających im przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe wśród, których można wymienić m.in.: zdolność do detoksykacji metali w protoplaście, czy ścianie komórkowej, jak również rozwinięcie się u niektórych gatunków roślin strategii życiowej typu „r” – wytworzenie się form roślin o skróconym cyklu życiowym i szybkim wchodzeniu w fazę generatywną. Liczne badania pokazują, że występują istotne różnice pomiędzy populacjami występującymi na obszarach zanieczyszczonych metalami ciężkimi oraz obszarami niezanieczyszczonymi, co sugeruje wyodrębnienie się nowych ekotypów, a nawet podgatunków (ABRATOWSKA I IN. 2012; BAKER, PROCTOR 1990; BAUMBACH, HELLWIG 2003; ERNST 2006; GODÉ I IN. 2012; HILDBRANDT I IN. 2006; KUTA I IN. 2014; LEFÈBVRE, VERNET 1990; WĄSOWICZ I IN. 2014; WIERZBICKA 2015; WIERZBICKA, ROSTAŃSKI 2002; WÓJCIK I IN. 2013).

Innym obszarem, gdzie mogą zajść procesy mikroewolucyjne są tory kolejowe. Panują tam warunki silnego nasłonecznienia a podłożem jest tłuczeń wymieszany z piaskiem rzeczonym (podłoże bardzo ubogie). Ponadto jest to środowisko zanieczyszczone m.in.: metalami ciężkimi oraz regularnie opryskiwane herbicydami. Zastanawiającym jest więc, w wyniku jakich procesów dochodzi do zasiedlania tej niszy ekologicznej m.in. przez rośliny *Geranium robertianum* L. (bodziszek cuchnący) (GALERA I IN. 2011, 2012, 2014; WIERZBICKA I IN. 2014). Warunki panujące na torach kolejowych są całkowicie odmienne od tych, które preferuje *G. robertianum* (zacienione i żyzne siedliska leśne o wysokiej zawartości fosforu i azotu w glebie) (TOFTS 2004). Badacze przez wiele lat szukali tzw. „specjalistów kolejowych”, czyli roślin występujących wyłącznie (lub przeważnie) wzdłuż linii kolejowych. Jednak przez wiele lat nie udało się ich znaleźć. Dopiero w badaniach WIERZBICKIEJ I IN. (2014) wykazano istnienie nowej, odrębnej formy (biotypu) *G. robertianum* na torach kolejowych w miejscowości Waliły-Stacja, którą można uznać za „specjalistę kolejowego”, ponieważ forma ta obecna była jedynie na torach kolejowych. Jest to doskonały przykład zachodzenia procesów mikroewolucyjnych u roślin na siedliskach antropogenicznych.

W niniejszej pracy doktorskiej zajęto się wyjaśnieniem jak procesy mikroewolucyjne mogły wpłynąć na wytworzenie się nowej formy *G. robertianum* opisanej przez WIERZBICKĄ I IN. (2014). Sprawdzono zróżnicowanie fenotypowe i genetyczne tej populacji w porównaniu do innych populacji *G. robertianum*. Zbadano także przystosowanie tego nowego biotypu do skrajnie trudnego siedliska jakim są tory kolejowe.

Na siedliskach antropogenicznych można obserwować wiele różnych procesów natury ekologicznej, gdyż dodatkowe czynniki wprowadzone przez człowieka do środowiska już, w ciągu 10-20 lat dają odpowiedź ze strony przystosowań organizmów żywych (WIERZBICKA 2015). Dobrze jest dostrzec silnie zmienione siedlisko i potraktować je, jako „poligon badawczy”, który pozwoli prześledzić zachodzące tam procesy.

I.2. TORY KOLEJOWE – „POLIGON BADAWCZY” DO BADANIA PROCESÓW MIKROEWOLUCYJNYCH

W niniejszej pracy doktorskiej „poligonem badawczym” do badania procesów mikroewolucyjnych były tory kolejowe. Niewiele wynalazków w dziejach zmieniło życie ludzi, tak jak kolej. Jej początki sięgają przełomu XVIII i XIX wieku. W odczuciu społeczeństwa transport kolejowy uchodzi za bezpieczny i przyjazny dla środowiska, jednak jest on źródłem emisji różnorodnych zanieczyszczeń. Specyfiką transportu kolejowego jest, oprócz złożoności samego procesu przewozowego, obecność stosunkowo rozbudowanej i skomplikowanej infrastruktury (BINKIEWICZ 2005; WIERZBICKA I IN. 2015; WIŁKOMIRSKI I IN., 2011, 2012).

Zagrożenia spowodowane funkcjonowaniem infrastruktury kolejowej związane są praktycznie ze wszystkimi komponentami środowiska – litosferą, hydrosferą, atmosferą i biosferą. Szkodliwe substancje zanieczyszczające grunt w okolicach obszarów kolejowych mogą przedostawać się z gleb do roślin występujących w otoczeniu torów oraz do innych grup organizmów żywych (BURKHARDT I IN. 2008; WIERZBICKA I IN. 2015; WIŁKOMIRSKI I IN., 2011, 2012). Różnorodne wykorzystanie obszarów kolejowych wiąże się z dużym zróżnicowaniem substancji zanieczyszczających glebę i rośliny w otoczeniu szlaków kolejowych. Do ich grupy można zaliczyć m.in.: herbicydy, metale ciężkie, WWA, PCB oraz substancje ropopochodne (m.in. oleje mineralne). Zanieczyszczenia te mogą być związane z różnego rodzaju czynnościami prowadzonymi na kolei. Problem ten dotyczy m.in. miejsc przeładunku paliw płynnych oraz ich tankowania, czy też używania na szlakach kolejowych środków chwastobójczych. Typowe dla kolei zanieczyszczenia gruntów pochodzą także ze zużytych olei mineralnych, układów smarowania silników spalinowych, zużycia elementów sieci trakcyjnej oraz szyn i hamulców pociągów, wycieków z pociągów olei smarnych i płynów kondensatorowych, przenikania substancji z podkładów kolejowych oraz z popiołu węglowego ścieżek zwirowych, czy wreszcie przewożenia i magazynowania paliw (BOBRYK 2015; BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; LIU I IN. 2009; MĘTRAK I IN. 2015; MORET I IN. 2007; SCHWEINSBERG I IN. 1999; THIERFELDER, SANDSTRÖM 2008; TORSTENSSON I IN. 2005; TORSTENSSON 2001; ZHANG I IN. 2012). Główne zanieczyszczenia występujące na torach kolejowych omówiono w rozdziałach I.3. i I.4.

Wszystkie powyższe czynniki sprawiają, że nasypy kolejkowe można uznać, za środowisko ekstremalnie trudne dla występowania tam roślin. Nie mniej, właśnie ta „ekstremalność” oraz pewna izolacja nasypów kolejowych sprawiają, że tory kolejowe wydają się być idealnym miejscem, gdzie z czasem może dochodzić do wystąpienia procesów mikroewolucyjnych wśród roślin występujących w tym antropogenicznym siedlisku.

I.3. GŁÓWNE ZANIECZYSZCZENIA NA TORACH KOLEJOWYCH

I.3.1. METALE CIĘŻKIE

Jak już wspomniano, jedną z grup zanieczyszczeń występujących na torach kolejowych są metale ciężkie. Pojęcie „metale ciężkie” to ogólny termin obejmujący grupę metali i półmetali o gęstości większej niż 5-6 g/cm³. Metale ciężkie, takie jak ołów, kadm,

rtęć, czy tal należą do grupy najgroźniejszych zanieczyszczeń środowiska. W odróżnieniu od niektórych organicznych substancji szkodliwych metale ciężkie występują naturalnie w minerałach skałotwórczych i rudach. Większość metali ciężkich to pierwiastki balastowe (np. Pb, Cd, Hg) obce, ale nie obojętne dla organizmów. Zdarzają się także metale (np. Zn, Cu), które w odpowiednio małych dawkach pełnią rolę biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Zanieczyszczenie metalami ciężkimi oznacza wystąpienie takiego stężenia metali, które przekracza poziom ich tła geochemicznego. Forma metali ciężkich w glebie może ulegać przeobrażeniu wskutek procesów glebotwórczych. Sposób wiązania metali ciężkich w glebie, a tym samym ich biodostępność, zależy m.in. od składu podłoża i jego właściwości fizykochemicznych. Górnictwo, przemysł metalurgiczny, elektronika, dodatki do paliw i smarów, materiały rolnicze, czy wreszcie transport samochodowy i kolejowy to tylko kilka z licznych źródeł, skąd metale ciężkie mogą trafiać do środowiska (ALLOWEY, AYRES 1999; HŁAWICZKA 2008; KABATA-PENDIAS I IN. 1995).

Toksycznymi skutkami zbyt dużych stężeń jonów metali ciężkich w roślinach są m.in.: zaburzenia w funkcjonowaniu błon komórkowych, zaburzenia fotosyntezy, oddychania, transpiracji, inhibicja białek i enzymów, zakłócenie transportu elektronów, czy też zahamowanie wzrostu roślin. Warto podkreślić, że metale ciężkie gromadzące się w tkankach roślin stwarzają zagrożenie dla kolejnych ogniw sieci pokarmowej, w tym także dla człowieka. W przypadku zwierząt i ludzi podstawowym działaniem szkodliwym, wywoływanym przez metale, są zmiany w syntezie białek i zaburzania wytwarzania ATP, uszkodzenie błon oraz inne, szeroko pojęte skutki biochemiczne. Często dochodzi do uszkodzenia układów: pokarmowego, nerwowego, oddechowego, czy krążenia. Uszkodzeniu ulegają także nerki, wątroba oraz inne narządy. Ponadto, nadmiar niektórych metali ciężkich może być jedną z przyczyn zmian nowotworowych (KABATA-PENDIAS, PENDIAS 1999; SEŃCZUK 2002; WIERZBICKA 2015).

Coraz więcej grup badawczych bada emisję metali ciężkich do środowiska przez transport kolejowy m.in. BURKHARDT I IN. 2008; LIU I IN. 2009; WIŁKOMIRSKI I IN. 2011, 2012; ZHANG I IN. 2012). Metalami ciężkimi, których emisja jest szczególnie związana z transportem kolejowym są miedź, mangan i cynk (LIU I IN. 2009; MAŁAWSKA, WIŁKOMIRSKI 2001B; WIŁKOMIRSKI I IN. 2012). W pracy BURKHARDT I IN. (2008) na przykładzie Szwajcarskich Kolei Federalnych pokazano, że metale ciężkie (takie jak żelazo, miedź, cynk, mangan, chrom, nikiel, wanad i ołów) należą do grupy głównych zanieczyszczeń emitowanych przez transport kolejowy. Zaś emisja metali ciężkich do środowiska oszacowana w tej pracy dla torów o długości 7200 km wyniosła około $2270 \text{ t} \cdot \text{rok}^{-1}$. Z kolei w pracy BOBRYK (2015), na przykładzie linii kolejowej nr 193 Chop – Uzhhorod – Sianky – Lwów pokazano pewne prawidłowości w rozprzestrzenianiu, akumulacji i rozproszeniu niektórych metali ciężkich (Cu, Pb, Zn, Ni) w glebie na obszarach w poprzek badanej linii kolejowej (w odległościach 0, 25, 50 i 100 m oraz 250 m traktowanych jako obszar kontrolny). Zwiększenie zawartości metali ciężkich w glebach występowało głównie na obszarach bezpośrednio stykających się z linią kolejową (do 25 m). Wraz z odległością od linii kolejowej poziom metali ciężkich w glebie spadał. Warto jednak zauważyć, że także w glebach kontrolnych (250 m od linii kolejowej) występowała akumulacja metali ciężkich

(ołowiu, cynku i niklu), jednak była ona znacznie mniejsza w porównaniu z obszarami w bezpośrednim sąsiedztwie badanej linii kolejowej (BOBRYK 2015).

Inną pracą poruszającą problem zanieczyszczeń na torach kolejowych, w tym metali ciężkich, jest praca WIERZBICKIEJ I IN. (2015), którą współtworzyła autorka niniejszej dysertacji. W ramach tej pracy wykonano wielowymiarową ocenę stopnia toksyczności podłoży z obszarów kolejowych za pomocą biotestów (roślinnego Phytotoxkit, zwierzęcych Ostracodtoxkit i Daphtoxkit, bakteryjnego Microtox) oraz analiz chemicznych. Przeprowadzono badania podłoży z torów kolejowych położonych w północno-wschodniej Polsce. Próbkę podłoży pochodziły z torów kolejowych ze stacji Białystok Fabryczny, Waliły, Hajnówka, Siemianówka oraz dużej stacji Ława Główna (WIERZBICKA I IN. 2015). Obszar Walił i Białegostoku Fabrycznego to obszary, z których pochodziły rośliny *G. robertianum*, badane w ramach niniejszej pracy, zatem warto omówić sytuację występującą w tych dwóch punktach. We wszystkich badanych podłożach odnotowano obecność metali ciężkich – najwięcej w podłożu ze stacji Białystok Fabryczny. Nie przekroczone jednak dopuszczalnych w tamtym okresie norm (Dz. U. 2002 R. NR 165, POZ. 1359). Średnią zawartością metali ciężkich charakteryzowało się podłoże ze stacji Waliły a najmniejszą podłoże ze stacji Siemianówka. Zawartość metali ciężkich wykrytych w glebach ze stacji Białystok Fabryczny i Waliły można porównać z pracami LIU I IN. (2009) oraz ZHGANG I IN. (2012), gdzie wykryty poziom różnych metali ciężkich na obszarach kolejowych pokrywał się lub wręcz był niższy niż w podłożach ze stacji Białystok Fabryczny i Waliły (m.in. Cu, Zn i Pb). Warto zaznaczyć w tym miejscu, że badania toksyczności z zastosowaniem biotestów wskazały podłoże z Białegostoku Fabrycznego, jako najbardziej toksyczne dla organizmów testowych spośród wszystkich badanych podłoży. Natomiast podłoże z Walił okazało się nietoksyczne dla badanych organizmów (WIERZBICKA I IN. 2015).

I.3.2. WIELOPIERŚCIENIOWE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, tzw. WWA (ang. PAH – *polynuclear aromatic hydrocarbons*) to związki zawierające dwa lub więcej sprzężonych węglowodorowych pierścieni aromatycznych. Są to produkty uboczne niecałkowitego procesu spalania i mogą tworzyć się z jakiegokolwiek źródła węglowodorów, jeżeli tylko wystąpią odpowiednie warunki. Węglowodory aromatyczne występują jako ciecze lub ciała stałe. WWA są dość reaktywne oraz podatne na przekształcenia chemiczne i biochemiczne (O'NEILL 1997; WALKER I IN. 2002).

WWA mogą pochodzić zarówno ze źródeł naturalnych (pożary lasów lub stepów, erupcje wulkanów), jak i źródeł antropogenicznych (m.in. pojazdów mechanicznych – piroliza benzyny i oleju napędowego w silnikach przy niedostatecznej ilości tlenu). Pozostałości smoły węglowej i ropy naftowej również zawierają duże ilości WWA. Dobrym źródłem WWA są np. węglowodory cykliczne, których obecność stwierdzono m.in. w olejach napędowych. Częsteczki WWA wykazują skłonność do absorbowania się na powierzchni cząstek sadzy i dymu. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne mogą wywoływać choroby nowotworowe (wyrażna toksyczność chroniczna). Wśród WWA najbardziej

niebezpieczny jest benzo[a]piren, który wykazuje silne działanie rakotwórcze i mutagenne (ALLOWAY, AYRES 1999; Manahan 2006; O'NEILL 1997; WALKER I IN. 2002).

WWA są często stwierdzanymi zanieczyszczeniami na obszarach kolejowych (BURKHARDT I IN. 2008; MĘTRAK I IN. 2015; MORET I IN. 2007; THIERFELDER, SANDSTRÖM 2008; WIŁKOMIRSKI I IN. 2011, 2012). Jednym ze źródeł WWA na obszarach kolejowych jest krezot stosowany do zabezpieczania drewnianych pokładów kolejowych (może on zawierać ponad 30 różnych WWA). Zarówno WWA, jak i substancje ropopochodne pojawiają się na terenach kolejowych także na przykład w wyniku transportu przez kolej niektórych substancji, używania lokomotyw spalinowych oraz wydostawania się na zewnątrz niektórych materiałów eksploatacyjnych (MORET I IN. 2007; THIERFELDER, SANDSTRÖM 2008; MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI 2001B; WIŁKOMIRSKI I IN. 2012). Jeżeli chodzi o skład WWA pojawiających się na obszarach kolejowych (podłoże i rośliny) to przykładowo na obszarze stacji Ława Główna stwierdzono m.in. fluoren, piren, benzo[a]antracen, chryzen, benzo[b]fluoranten, benzo[k]fluoranten, benzo[a]piren oraz benzo[e]piren (MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI 2001B; WIŁKOMIRSKI I IN. 2011, 2012).

We wspomianej już pracy WIERZBICKA I IN. (2015), najwyższe zawartości WWA spośród badanych podłoży pochodzących z obszarów kolejowych wykryto w glebie ze stacji Białystok Fabryczny, zaś najniższe w podłożu ze stacji w Waliłach. Wyniki te można odnieść do pracy MALAWSKIEJ I WIŁKOMIRSKIEGO (2001B), gdzie badano m.in. gleby i rośliny ze stacji Ława Główna – obszar ten uznano za znacząco zanieczyszczony przez WWA. W stosunku do próbek z Ławy Głównej, zawartości WWA w podłożach ze stacji Białystok Fabryczny i Waliły były wyższe niż te stwierdzone w Ławie Głównej, zwłaszcza w Białymstoku Fabrycznym. Wartości te nie przekraczały jednak dopuszczalnych w tamtym okresie norm dla terenów komunikacyjnych (Dz. U. 2002 R. NR 165, POZ. 1359).

I.3.3. POLICHLOROWANE BIFENYLE

Polichlorowane bifenyly (PCB – ang. *polychlorinated biphenyl*) to grupa związków zawierających od jednego do dziesięciu atomów chloru w cząsteczce bifenyly. Grupa ta obejmuje 209 możliwych połączeń (tzw. kongenerów) o różnej zawartości i usytuowaniu atomów chloru. PCB są stabilnymi cieczami o małej lotności. Ich mieszaniny wykazują słabą rozpuszczalność w wodzie, za to dobrą w olejach i rozpuszczalnikach organicznych o słabej polarności. PCB to związki o słabej reaktywności chemicznej, odporne termicznie, niepalne o wysokiej stałej dielektrycznej (wysokiej oporności elektrycznej). Polichlorowane bifenyly wykorzystywano m.in. jako składniki farb, plastyfikatory tworzyw sztucznych oraz materiały izolujące w transformatorach, silnikach i innych urządzeniach, czy wreszcie jako składnik płynów do wymienników cieplnych, substancji powłokowych, wypełniaczy, klejów, lakierów pokostowych, atramentów i papierów do kopiowania. PCB mogą rozprzestrzeniać się na duże odległości. Obecnie w wielu krajach stosowanie PCB jest zakazane lub znacznie ograniczone. PCB bardzo powoli ulegają biodegradacji, dlatego pomimo zmniejszenia ich emisji, wciąż występują w środowisku i organizmach żywych (ALLOWAY, AYRES 1999; MANAHAN 2006; O'NEILL 1997; SEŃCZUK 2002; WALKER I IN. 2002).

PCB ulegają bioakumulacji w łańcuchach pokarmowych, przez co stają się groźne dla ludzi i zwierząt. Związki te szybko przenikają do krwi, a następnie do większości tkanek (bioakumulują się w tkance tłuszczowej). Polichlorowane bifenyle przenikają także przez barierę łożyskową oraz do mleka. Polichlorowane bifenyle wywołują liczne zaburzenia biochemiczne (SEŃCZUK 2002).

Przykładowo w pracach MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI (1999, 2001A) stwierdzono podwyższone zawartości PCB w glebie i roślinach na terenach węzłów kolejowych w pobliżu stacji Iława Główna i Tarnowskie Góry oraz dwóch ważnych linii kolejowych Warszawa-Gdańsk (obszar w pobliżu miasta Iłowo) oraz Katowice-Gdynia (obszar w pobliżu Warlubie i Laskowic). Porównanie danych z tych prac (MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI 1999, 2001A) z wynikami uzyskanymi w pracy WIERZBICKA I IN. (2015), pokazuje że jedynie podłoże ze stacji Białystok Fabryczny charakteryzował podobny poziom zanieczyszczenia związkami PCB (w próbce z Walił zawartość tych substancji była niska). Wartości te nie przekraczały jednak ówczesnej normy (Dz. U. 2002 R. NR 165, POZ. 1359).

Wysoko chlorowane PCB są adsorbowane na powierzchni gleby o wysokiej zawartości substancji organicznych, np. zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi – w takim przypadku PCB nie przenikają w głąb podłoża. Zatem migracja PCB na obszarach kolejowych w dużej mierze zależy od obecności substancji ropopochodnych, które mogą zalegać na powierzchni gleby i dopiero po ich rozłożeniu PCB mogą wnikać w głąb podłoża. Podsumowując, badania pokazują, że zawartość PCB w podłożu na obszarach kolejowych jest dość zróżnicowana (MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI 1999; MALAWSKA, WIŁKOMIRSKI 2001A; WIERZBICKA I IN. 2015; WIŁKOMIRSKI I IN. 2012).

I.3.4. SUBSTANCJE ROPOPOCHODNE

Podstawowymi składnikami ropy naftowej są węglowodory nasycone. Nie zawiera ona alkenów, ale mogą w niej występować węglowodory aromatyczne. Substancje ropopochodne powszechnie wykorzystuje się np. w transporcie, energetyce, czy przemyśle chemicznym (ALLOWAY, AYRES 1999; GIERAK 1995). Substancje ropopochodne mogą przedostawać się do gruntu i wód podziemnych. Rozlane na powierzchni gleby po pewnym czasie ulegają sorpcji na jej cząsteczkach. Substancje ropopochodne przedostające się w głąb gleby powodują jej zbrylanie i zmianę właściwości fizykochemicznych, biologicznych oraz pogorszenie zdolności produkcyjnych (GIERAK 1995).

Znaczna ilość składników wchodzących w skład ropy naftowej i jej produktów sprawia, że mechanizm działania toksycznego tych substancji jest dość zróżnicowany. Na przykład bardzo toksyczne są już pary węglowodorów o 5 – 8 atomach węgla w cząsteczce. Wywołują one zgon u zwierząt doświadczalnych. Są to związki o dużej neurotoksyczności (osłabienie ruchowe mięśni kończyn, przechodzące w porażenie i niedowład), które razem z węglowodorami aromatycznymi odpowiadają za znaczny stopień toksyczności ropy naftowej i jej produktów. Ropa naftowa wykazuje również działanie silnie drażniące na skórę, prowadzące do mnożenia się komórek nabłonka i powstania złośliwego nowotworu skóry – nabłonniaka. Produkty destylacji ropy naftowej, takie jak nafta, benzyna lekka i ciężka, olej

gazowy i napędowy, stosowane m.in. jako paliwa i rozpuszczalniki, to również substancje niebezpieczne. Mogą one wywoływać np. zmiany w nerkach, wątrobie i szpiku oraz uszkadzać i hamować czynności układu nerwowego (SEŃCZUK 2002).

BURKHARDT I IN. (2008) podają, że zużycie w 2005 roku przez Szwajcarskie Koleje Federalne różnych olei i smarów wyniosło około 580,000 litrów. W pracy WIERZBICKA I IN. (2015) wskazano, że próbki, w których wykryto najwyższe zawartości substancji ropopochodnych – próbka ze stacji Białystok Fabryczny (suma benzyn: 134.1 ± 40.2 mg/kg; suma olei mineralnych: 2520.0 ± 730.8 mg/kg) oraz ze stacji Siemianówka (suma benzyn: 92.1 ± 27.6 mg/kg; suma olei mineralnych: 1099.0 ± 318.7 mg/kg) były najbardziej toksyczne dla organizmów testowych ze wszystkich poziomów troficznych. Z kolei podłoże z Walił, w którym wykryto zdecydowanie niższe zawartości substancji ropopochodnych niż w próbkach z Białegostoku i Siemianówki, okazały się nietoksyczne dla organizmów testowych (WIERZBICKA I IN. 2015). Badania pokazują, że obecność na obszarach kolejowych substancji ropopochodnych (BURKHARDT I IN. 2008; WIŁKOMIRSKI I IN. 2012; WIERZBICKA I IN. 2015) może stanowić zagrożenie dla środowiska.

I.3.5. HERBICYDY

Herbicydy to ostatnie z omawianych zanieczyszczeń powszechnie pojawiających się na obszarach kolejowych. Herbicydy stosuje się w celu usunięcia niepożądanego roślinności z nasypów kolejowych. Występowanie roślinności na nasypach kolejowych przyspiesza niszczenie podsypki stosowanej na nasypach i zmniejsza jej przepuszczalność. Prowadzi to do gnicia drewnianych podkładów i odkształcania torów, a także powoduje korozję nawierzchni torowej. Odchwaszczanie torów wykonuje się z użyciem specjalnych maszyn, takich jak odchwaszczarki ciśnieniowe oraz opryskiwarki rolnicze umieszczone na taborze kolejowym. Użycie takich maszyn umożliwia oprysk torowiska na szerokości 5 m. Odchwaszczanie torów kolejowych odbywa się zgodnie z harmonogramem ustalonym przez dyrekcję okręgową kolei państwowych, a odchwaszczanie torów na stacjach powinno odbywać się według harmonogramu, opracowanego przez zawiadowcę odcinka drogowego (naczelnika sekcji) i kierownika technicznego pociągu, po uzgodnieniu z zawiadowcą stacji (BACH 2018; BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; BURKHARDT I IN. 2008; SCHWEINSBERG I IN. 1999; TORSTENSSON 2001; TORSTENSSON I IN. 2005).

Herbicydy to środki chemiczne wykorzystywane do hamowania rozwoju i niszczenia niepożądanego roślinności. Podział herbicydów na grupy jest dość zróżnicowany. Herbicydy dzieli się na przykład ze względu na budowę chemiczną substancji czynnych w nich stosowanych, mechanizm ich działania, sposób wnikania substancji aktywnej, ich selektywność, czy wreszcie termin ich stosowania. Herbicydy działają na wiele procesów życiowych roślin. Dlatego w niektórych przypadkach trudno jest wskazać, który proces jest zakłócony w pierwszej kolejności, a który jest związany z działaniem wtórnym. Działanie herbicydów polega na zakłóceniu prawidłowego przebiegu procesów fizjologicznych (np. herbicydy mogą oddziaływać na białka pełniące kluczowe funkcje fizjologiczne) lub metabolicznych (herbicydy mogą oddziaływać na enzymy z podstawowych szlaków metabolicznych) u roślin. Generalnie herbicydy wpływają na cztery zasadnicze reakcje

biochemiczne w roślinie: oddychanie i mitochondrialny transport elektronów, fotosyntezę, metabolizm kwasów nukleinowych i syntezę białek, czy wreszcie metabolizm tłuszczów (ADAMCZEWSKI 2014; DAYAN I IN. 2010; MOTOOKA I IN. 2002).

Herbicydy oprócz substancji czynnej / aktywnej, która jest głównym związkiem niszczącym rośliny, zawierają wiele dodatkowych substancji, które mają poprawić ich działanie (np. ułatwić wnikania herbicydu do wnętrza rośliny). Są to tzw. adiuwanty. Do takich związków możemy zaliczyć surfaktanty, czyli substancje powierzchniowo czynne, które jak np. polietoksyłowane aminy mogą ułatwiać adsorpcję i zwiększać efektywność wnikania preparatu do wnętrza komórek roślinnych. Adiuwanty mogą być równie toksyczne, co substancje aktywne poszczególnych herbicydów (KWIATKOWSKA I IN. 2013; LIU 2004; WANG, LIU 2007).

Jednym z najczęściej stosowanych herbicydów na obszarach kolejowych jest Roundup, którego substancją czynną jest glifosat. Dawka zalecana przez producenta preparatu Roundup do stosowania na torach kolejowych wynosi 7 l/ha, czyli 3,5 l/km toru, gdy szerokość pasa odchwaszczanego wynosi 5 m. Opryski powinno wykonywać się w okresie intensywnego wzrostu roślin zielonych. Dawki i terminy wykonywania oprysków powinny być również dobrane względem występujących tam roślin (ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP 360 SL). Badania pokazują, że zarówno glifosat, jak i główny produkt jego rozkładu AMPA wnikają w przeważającej ilości przypadków nie głębiej niż na 30 cm w głąb nasypu kolejowego, choć mogą przedostać się nawet do 60 cm w głąb nasypu (BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; TORSTENSSON 2001; TORSTENSSON I IN. 2005). Glifosat jest silnie adsorbowany w nasypach kolejowych. Po zastosowaniu na nasypie kolejowym 3 l/ha preparatu Roundup Bio czas połowicznego zaniku (DT_{50}) glifosatu oraz AMPA wynosił najczęściej między 2 a 5 miesięcy od aplikacji herbicydu, w niektórych przypadkach substancje te zalegały nawet dłużej. Czas potrzebny na zanik 90% zastosowanej ilości herbicydu (DT_{90}) wynosił najczęściej od 1 do 2 lat (BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; TORSTENSSON 2001; TORSTENSSON I IN. 2005). Badania pokazują, że stosowanie herbicydów na nasypach kolejowych negatywnie wpływa na aktywność mikrobiologiczną, przez co czas rozkładu herbicydów może ulec wydłużeniu (CEDERLUND, STENSTRÖM 2004).

Dla porównania, w pracy WIERZBICKIEJ I IN. (2015) nie wykryto ani w Białymstoku Fabrycznym, ani w Waliłach herbicydów w podłożu, czy też produktów ich rozkładu. Przyczyną tego mógł być fakt, że od zbioru próbek do analiz minął zbyt długi czas oraz to, że czasowo zamknięto linię kolejową nr 37 dla transportu osobowego na trasie Białystok-Zubki Białostockie (lata 2000-2016). Linią odbywał się jedynie transport towarowy do stacji Waliły, który został zakończony 10 grudnia 2012 roku. W związku z zaprzestaniem użytkowania stacji kolejowej w Waliłach możliwe, że zaniechano po 2012 r. oprysków herbicydami na tym obszarze. W lipcu 2016 roku reaktywowano ruch pasażerski. Obecnie pociągi na linii nr 37 kursują w okresie letnio-jesiennym (Banach 2016A, B; Rynek Kolejowy 2017; Wrota Podlasia 2016A, B; WIERZBICKI 2013).

I.4. SKUTKI STOSOWANIA HERBICYDÓW NA TORACH KOLEJOWYCH

Wykorzystanie na torach kolejowych herbicydów w celu usunięcia niepożądanego rośliności jest szczególnie interesującym zagadnieniem, gdyż długotrwałe stosowanie tych środków może powodować wytworzenie się biotypów roślin odpornych na dany herbicyd, co jest przejawem wystąpienia procesów mikroewolucyjnych (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI I IN. 2011; KWIATKOWSKA I IN. 2013; NANDULA I IN. 2005; PEREZ-JONES I IN. 2007; SHRESTHA 2010). Stres wywołany działaniem herbicydów, może przyczyniać się do pozytywnej selekcji roślin. Taka selekcja wynika z tego, iż zdolne do przetrwania są tylko organizmy o dużej odporności na stres i zdolności do przystosowania się do panujących warunków stresowych. W aspekcie ewolucyjnym w wyniku selekcji mogą powstać formy, które uodporniły się na czynniki stresowe. W wyniku częstego stosowania herbicydów osobniki odporne mogą zacząć dominować w niszy ekologicznej (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI, DOBRZAŃSKI 2012A, B; LARCHER 1987).

Tory kolejowe są bardzo dobrym obiektem do oceny skutków stosowania przez wiele lat herbicydów, w celu usunięcia niepożądanego rośliności. Jest tak, ponieważ na torach kolejowych stosowane dawki są wysokie w porównaniu do dawek stosowanych na obszarach rolniczych, oraz są stosowane regularnie od kilkudziesięciu lat (ADAMCZEWSKI I IN. 2011; BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; BURKHARDT I IN. 2008; SCHWEINSBERG I IN. 1999; TORSTENSSON 2001; TORSTENSSON I IN. 2005). Dzięki temu można sprawdzić, czy dany gatunek roślin uzyskuje odporność na herbicyd i jakie są skutki środowiskowe nadmiernego jego stosowania.

Stosowanie herbicydów na torach kolejowych wprowadzono w latach dwudziestych dwudziestego wieku. Początkowo stosowano wyłącznie chloran sodu. Od około 1950 r. wprowadzono nowe herbicydy do zwalczania chwastów (SCHWEINSBERG I IN. 1999). Przykładowo, w Niemczech 90% łącznej ilości około 19 000 t herbicydów zastosowanych w roku 1990 było stosowanych w rolnictwie na powierzchni 120 000 km², czyli stosowano 1,4 t na hektar. Dla porównania w tym samym roku, na torach kolejowych w Niemczech użyto herbicydów w ilości około 200-250 t na powierzchni 245 km², co odpowiada 8-10 t na hektar. Zatem ilość herbicydów zastosowana na torach kolejowych była sześć razy większa niż ta zastosowana w rolnictwie (SCHWEINSBERG I IN. 1999).

Również w Polsce tory kolejowe to miejsce, gdzie dokonuje się znacznych i regularnych oprysków herbicydami (ADAMCZEWSKI I IN. 2011; MĘTRAK I IN. 2015). Możliwość powstawania form roślin odpornych na działanie herbicydu może być skutkiem ubocznym tych działań, ale bardzo istotnym i niekorzystnym.

I.4.1. HERBICYD ROUNDUP I JEGO SUBSTANCJA CZYNNA – GLIFOSAT

Jednymi z najczęściej stosowanych herbicydów do niszczenia chwastów na torach kolejowych są środki zawierające glifosat (N-fosfonometyloglicyna, CAS 1071-83-6) (FIG. 2). Jest to jedna z najbardziej znanych i najpowszechniej używanych substancji czynnych w herbicydach. Glifosat występuje jako substancja czynna w ponad 90 preparatach handlowych. Jednym ze środków zawierających glifosat w postaci soli izopropylaminowej

jest Roundup – dolistny, nieselektywny herbicyd o działaniu układowym (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI I IN. 2011; BAYLIS 2000; BURKHARDT I IN. 2008; BÖRJESSON, TORSTENSSON 2000; TORSTENSSON I IN. 2005; ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP 360 SL; KARTA CHARAKTERYSTYKI ŚRODKA ROUNDUP 360 SL; KUDSK I STREIBIG 2003; PIENIAŻEK I IN. 2003; TORSTENSSON 2001; WIERZBICKIA I IN. 2014, 2015). Herbicydy systemiczne (układowe) mogą przemieszczać się w obrębie tkanek roślinnych – od liści do korzeni lub odwrotnie. Mimo wolniejszego działania herbicydów systemicznych są one skuteczniejsze od herbicydów kontaktowych (DAS I MONDAL 2014).

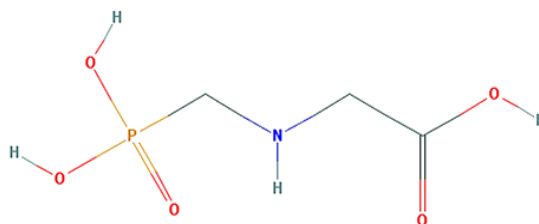


FIGURA 2. Wzór strukturalny glifosatu (PUBCHEM: 3496).

Aby zrozumieć dlaczego niektóre gatunki roślin wykazują odporność na Roundup należy przyjrzeć się mechanizmowi działania jego substancji czynnej – glifosatowi. Głównym mechanizmem działania glifosatu jest inhibicja enzymu 5-enolopirogronianio-szikimo-3-fosforanu (EPSP). Jest to kluczowy enzym szlaku szikimowego występującego u roślin, grzybów i mikroorganizmów. Jego zahamowanie skutkuje brakiem syntezy niezbędnych aminokwasów aromatycznych (tryptofanu, fenyloalaniny, tyrozyny). Prowadzi to do zaburzenia syntezy białek i śmierci komórki (KISHORE I IN. 1992; KWIATKOWSKA I IN. 2013; SCHUETTE 1998). Innym mechanizmem działania glifosatu jest desykacja, czyli odwodnienie tkanek roślin. Zamknięcie aparatów szparkowych ogranicza respirację wywołując zakłócenia w procesie fotosyntezy (KWIATKOWSKA I IN. 2013; PARREIRA I IN. 2015; WRÓBEL 2007).

Rośliny po oprysku glifosatem absorbują go w większości bardzo szybko. Po przedostaniu się do rośliny glifosat wraz z produktami fotosyntezy przemieszcza się we floemie oraz w mniejszym stopniu ksylemem. Działanie glifosatu objawia się zahamowanym wzrostem roślin, powstawaniem chloroz i nekroz, żółknięciem liści i pędów, a następnie zamieraniem całych części nadziemnych i korzeni (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI I IN. 2011; CAMPBELL I IN. 1976; TUFFI SANTOS I IN. 2009).

Wchłanianiu substancji czynnej preparatu Roundup (glifosatu) do rośliny sprzyjają adiuwanty. Głównym adiuwantem i surfaktantem zawartym w herbicydzie Roundup jest MON 0818 (kod stosowany w firmie Monsanto, też MON 0139), czyli polietoksyłowane aminy tłuszczowe – POEA (ang. *polyethoxylated tallow amine*), o numerze CAS 61791-26-2 (FIG. 3). Zawartość tego surfaktantu w preparatach Roundup wynosi do 15%. Ułatwia on penetrację glifosatu poprzez woski kutykularne obecne na powierzchni liści rośliny (GIESY I IN. 2000; WILLIAMS I IN. 2000). Wartość równowagi hydrofilowo-lipofilowej MON 0818 (wynosząca 16) umożliwia szybką penetrację przez kutikulę i niszczenie integralności błon komórkowych leżących pod nią komórek, zwiększając wchłanianie glifosatu (LEAPER I HOLLOWAY 2000). W ciągu 6 godzin po zastosowaniu Roundupu następuje gwałtowna absorpcja MON 0818, natomiast maksimum absorpcji (84%) przypada na 24 godziny po aplikacji (SHERRICK I IN. 1986). Już po upływie 7-10 dni od zastosowania środka Roundup

można zaobserwować pierwsze zmiany, tj. żółknięcie i więdnienie liści. Po około 3 tygodniach następuje całkowite obumieranie roślin. Wysoka temperatura i wilgotność powietrza, a także silne nasłonecznienie sprzyjają skuteczniejszemu działaniu herbicydu (ADAMCZEWSKI 2014; ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP 360 SL; KARTA CHARAKTERYSTYKI ŚRODKA ROUNDUP 360SL).

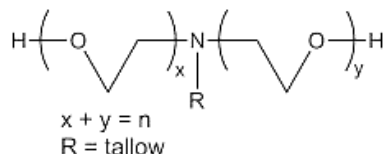


FIGURA 3. Wzór strukturalny POAE (TUSH I IN. 2013).

I.5. ROŚLINNOŚĆ WYSTĘPUJĄCA NA TORACH KOLEJOWYCH

Pomimo niesprzyjających warunków środowiskowych oraz regularnych oprysków herbicydami na torach kolejowych spotyka się różne gatunki roślin. Linie kolejowe stanowią dogodne miejsca do rozprzestrzeniania się pewnych gatunków roślin w wyniku rozsiewania się diaspor z okolicznych ekosystemów lub na skutek przypadkowego ich zawlekania z odległych ekosystemów podczas transportu kolejowego. Zróżnicowana mozaika siedlisk występująca na obszarach kolejowych sprzyja zadamawianiu się tam roślin z różnych grup ekologicznych. Największą szansą na przetrwanie na tych siedliskach mają jednak rośliny o szerokiej amplitudzie ekologicznej, a szczególnie preferujące siedliska nasłonecznione, suche, o dużej sile rozmnażania (zarówno wegetatywnego, jak i generatywnego), odporne na zanieczyszczenia, występujące na obszarach kolejowych (FORNAL-PIENIAK, WYSOCKI 2010; KRYSZAK I IN. 2006; ŚWIĘS, MAJKUT 2006).

Najczęściej spotykanymi gatunkami roślin na nasypach kolejowych są hemikryptofity i terofity. Ich zdolność do tolerancji suchych warunków i dużego nasłonecznienia oraz krótki cykl życiowy umożliwia tym roślinom przeżycie na nasypach kolejowych (GALERA I IN. 2012, 2014). Odnotowuje się tam również wiele leśnych, ruderalnych i synantropijnych gatunków roślin. Tory kolejowe są „korytarzem”, którym rośliny „wędrują” do innych siedlisk (GALERA I IN. 2011; KORNAŚ I IN. 1959; NAVRATILOVA, WINKLER 2014).

Wśród stwierdzonych w północno-wschodniej Polsce gatunków występujących na nasypach kolejowych wyróżniał się gatunek *Geranium robertianum* L., który masowo występował na torach kolejowych pomimo, że jest to środowisko ekstremalnie trudne dla tych roślin, podlegające insolacji, ubogie w wodę i składniki mineralne, zanieczyszczone m.in.: metalami ciężkimi, WWA i PCB oraz regularnie opryskiwane herbicydami (GALERA I IN. 2011, 2012; WIERZBICKA I IN. 2014).

Badacze przez wiele lat szukali tzw. „specjalistów kolejowych”, czyli roślin występujących wyłącznie (lub przeważnie) wzdłuż linii kolejowych. Jedną z prac poruszających to zagadnienie są badania WIERZBICKIEJ I IN. (2014), które stanowiły punkt wyjścia do podjęcia badań opisanych w niniejszej dysertacji. Badania WIERZBICKIEJ I IN. (2014) wskazują na powstanie odrębnej formy (biotypu) *G. robertianum* na nasypach kolejowych w północno-wschodniej Polsce w miejscowości Waliły-Stacja. Torowa populacja

G. robertianum z Walił wykazywała adaptacje do niekorzystnych warunków panujących na torach kolejowych, dlatego uznano ją za „specjalistę kolejowego”.

W ramach badań WIERZBICKIEJ I IN. (2015), w których brała udział autorka niniejszej dysertacji, wykazano, że podłoże z Walił-Stacji było nietoksyczne dla badanych organizmów testowych oraz, że było najmniej zanieczyszczone spośród wszystkich badanych podłoży. Zatem, zanieczyszczenia występujące w podłożu z Walił mogły nie być wystarczająco silnym czynnikiem selekcyjnym pozwalającym na wyodrębnienie się nowej formy *G. robertianum* w Waliłach (pomimo podejrzenia, że takim czynnikiem mogły być opryski herbicydami). Dlatego też, w ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, co poza zanieczyszczeniami mogło być czynnikiem selekcyjnym, który pozwolił na wyodrębnienie się nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach.

I.6. BIOLOGIA I EKOLOGIA *GERANIUM ROBERTIANUM* L.

Geranium robertianum L. (FIG. 4) to roślina zielna z rodziny bodziszkowatych (Geraniaceae Juss.). Jest to gatunek o rocznym lub dwuletnim cyklu rozwojowym, choć niektórzy autorzy sugerują, że gatunek ten może być również wieloletni. *G. robertianum* jest klasyfikowany wg systemu Raunkiaera jako hemikryptofit lub rzadziej przez niektórych autorów jako terofit (BERTIN 2001; FALINSKA, PIROZNIKOV 1983; GRIME I IN. 1988; TOFTS 2004; VANDELOOK, VAN ASSCHE 2010). Jej liście tworzą rozgałęzioną wprost od podłoża rozetę, o wysokości 10–50 cm, osadzoną na mocno skróconej łodydze. Liście *G. robertianum* składają się od 3 do 5 listków o pierzastym unerwieniu. Mogą mieć kolor jasno lub ciemnozielony oraz przyjmować czerwonawe zabarwienie. *G. robertianum* to gatunek o wiązkowym systemie korzeniowym (TOFTS 2004).



FIGURA 4. *Geranium robertianum* L. (WILD FLOWERS OF NEW YORK 1918).

Cała roślina pokryta jest włoskami gruczołowymi, które wydzielają charakterystyczny zapach. Występują trzy rodzaje włosków wydzielniczych – typ I i II wydzielają terpenoidy i fenole – występują na liściach, zaś typ III jest bardziej powszechny na strukturach kwiatu – włoski te wydzielają flawonoidy i gromadzą antocyjany (PEDRO I IN. 1990).

Kwiaty *G. robertianum* przeważnie występują parami i osadzone są na szypułkach. Składają się one z pięciu owłosionych działek kielicha o długości 7–9 mm oraz z pięciu płatków kielicha, których ubarwienie może być jasnoróżowe bądź rzadziej białe. W kwiecie występuje dziesięć pręcików, w dwóch okółkach, które mogą być koloru różowego, pomarańczowego lub fioletowego. Ziarna pyłku są trzybrzdowe. *G. robertianum* rozmnaża się generatywnie. Jego owocem jest rozłupka (ENDRESS 2010; TOFTS 2004; WEBER 1996).

G. robertianum kwitnie i owocuje równocześnie od maja do października. Siewki tej rośliny pojawiają się kilkakrotnie w ciągu roku. Wyróżnia się trzy kohorty: wiosenną, letnią i jesienną. Najmniejszą liczbą siewek charakteryzuje się kohorta jesienna, a największą wiosenna. Występowanie trzech kohort skutkuje tym, że w okresie od wiosny do jesieni spotyka się rośliny w różnych fazach życiowych: siewki, osobniki juwenilne, kwitnące i wytwarzające owoce (BERTIN 2001; FALINSKA, PIROZNIKOV 1983; TOFTS 2004).

G. robertianum preferuje zacienione i wilgotne siedliska leśne. Jest to roślina występująca na żyznych glebach, bogatych w substancje odżywcze. Nie występuje na glebach o odczynie niższym niż 4,5. Natomiast obficie pojawia się na glebie o odczynie wyższym niż 5,5 (TOFTS 2004). Badania BURIÁNEK I IN. (2013) pokazują także, że jest to gatunek nitrofilny. Na obszarach leśnych, gdzie występował *G. robertianum* w glebach było statystycznie więcej azotu niż w miejscach, gdzie brakowało tego gatunku.

Roślina ta występuje powszechnie prawie na całym świecie (FIG. 5). *G. robertianum* występuje w Europie (od Skandynawii, przez Wyspy Brytyjskie, aż po region Morza Śródziemnego). Gatunek ten pojawia się również w Rosji, wschodniej Syberii, a także centralnej Azji. Wystąpienia *G. robertianum* stwierdzono ponadto w Afryce, na terenie Ugandy. Bodziszek cuchnący został zawleczony na tereny Japonii i wschodnich Chin oraz Nowej Zelandii. *G. robertianum* rozprzestrzenił się również w Ameryce Północnej i Południowej (AEDO 2000; NISHIDA I IN. 2012; SHISHKIN, BOBROV 1974; TOFTS 2004). *G. robertianum*, poza obszarami leśnymi, można spotkać również na obszarach, takich jak: tereny kolejowe, szczeliny budynków lub na nieużytkach rolnych (FALINSKA, PIROZNIKOV 1983; GRIME I IN. 1988; VANDELOOK I VAN ASSCHE 2010; TOFTS 2004).

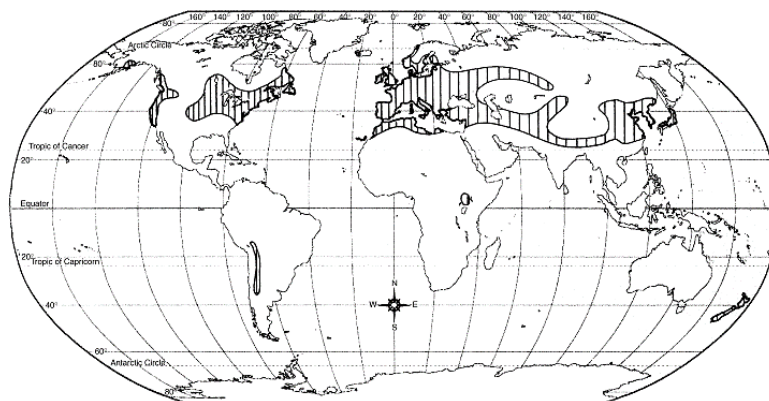


FIGURA 5. Przybliżone występowanie *G. robertianum* (TOFTS 2004).

I.7. EKOLOGIA MOLEKULARNA

Istotnym punktem niniejszej pracy doktorskiej było sprawdzenie jaka jest ranga taksonomiczna nowo odkrytej formy *G. robertianum* porastającej tory kolejowe w miejscowości Waliły-Stacja. Sprawdzano także czy populacja *G. robertianum* z Walił pod względem genetycznym istotnie różni się od roślin z innych populacji tego gatunku. Z tego powodu należy zarówno wytłumaczyć, czym zajmuje się ekologia molekularna, jak i przybliżyć metodykę badawczą wykorzystywaną w badaniach molekularnych.

Ekologia molekularna pojawiła się w postaci jaką obecnie znamy dopiero w latach osiemdziesiątych XX wieku. Od tamtej pory jej rozwój przebiega bardzo szybko. Ekologia molekularna jest nauką interdyscyplinarną i obejmuje szeroki zakres badań m.in. z zakresu: genetyki populacyjnej, ewolucji molekularnej, ekologii, zastosowania genetyki w ochronie środowiska, czy wreszcie biogeografii. Różnorodną tematykę badań łączy fakt wykorzystywania danych molekularnych do zrozumienia ekologii i ewolucji różnych gatunków organizmów. Pierwsze próby wykorzystania metod genetyki molekularnej w ekologii opierały się na wykorzystywaniu danych pochodzących z analizy allozymów (alternatywnych form białek kodowanych przez różne allele z danego *locus*). Właśnie dane z zakresu genetyki populacji pochodzące z badań nad allozymami wykazały, że zmienność genetyczna w populacjach naturalnych jest znacznie większa niż dotychczas sądzono (AVISE 2008; FREELAND 2008). Metody molekularne są coraz częściej stosowane w badaniach ekologicznych (AVISE 2008; FREELAND 2008; MULLIS, FALOONA 1987; NOWAK, GRUSZCZYŃSKA 2007; PILOT I IN. 2005; RASZKA I IN. 2009). Współczesne laboratoria rutynowo stosują takie techniki, jak m.in.:

- **różne metody izolacji DNA, RNA, białek;**
- **PCR** – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase chain reaction*), która służy do amplifikowania (wytworzeniu bardzo wielu kopii) określonych regionów DNA;
- **elektroforeza** – rozdział cząsteczek (np. DNA, białek) w nośniku (żelu) umieszczonym w polu elektrycznym;
- **hybrydyzacja** – technika, w której łączy się krótki fragment DNA lub RNA o znanej sekwencji (tzw. sondę) z materiałem genetycznym zawartym w badanej próbce, o sekwencji komplementarnej do sondy;
- **klonowanie DNA** – łączenie ze sobą dowolnych fragmentów DNA z plazmidowym DNA i wprowadzanie ich do układu, w którym uzyskany hybrydowy DNA może się namnażać i ulegać ekspresji;
- **sekwencjonowanie** – metoda odczytywania sekwencji (kolejności par nukleotydowych w cząsteczce DNA), identyfikująca konkretne różnice w nukleotydach między osobnikami;
- **analiza restrykcyjna;**
- **polimorfizm wybranych markerów genetycznych.**

Analiza DNA w badaniach ekologicznych jest stosowana m.in. do: identyfikacji gatunkowej, oceny liczebności populacji, analizy zależności między strukturą przestrzenną populacji a strukturą genetyczną, badania systemów rozrodu, oznaczania płci, badania

migracji, czy wreszcie różnorodności genetycznej. W oparciu o dane dotyczące zmienności genetycznej badanych populacji można wnioskować na temat procesów zachodzących w obrębie populacji, takich jak na przykład: migracje, dryf genetyczny, czy zmiany demograficzne (AVISE 2008; FREELAND 2008; PILOT I IN. 2005).

Istnieje wiele różnych współczynników opisujących różnorodność i strukturę genetyczną populacji (FREELAND 2008; HARTL, CLARK 1997; PILOT I IN. 2005; STEARNS, HOEKSTRA 2000; WRIGHT 1931, 1951, 1978). Wśród nich można wymienić m.in.:

- **współczynnik różnorodności genetycznej (h)** – miara zmienności genetycznej, opierająca się na prawdopodobieństwie, że dwa allele losowo wybrane z populacji będą różne (w przypadku *loci* jądrowych stosowany jako ekwiwalent heterozygotyczności oczekiwanej);
- **różnorodność alleliczna (A)** – miara zmienności genetycznej populacji obliczana jako średnia liczba alleli w *locus*;
- **równowaga Herdy’ego-Weiberga (HWE)** – przewidywalna proporcja frekwencji genotypów w nieskończonej wielkiej populacji rozmnażającej się płciowo, w której krzyżowanie się osobników jest losowe a selekcja nie działa;
- **heterozygotyczność obserwowana (H_o)** – poziom heterozygotyczności stwierdzony w badanej populacji, zwykle prezentowany jako średnia wartość heterozygotyczności we wszystkich analizowanych *loci*;
- **heterozygotyczność oczekiwana (H_e)** – miara zmienności genetycznej odzwierciedlająca poziom heterozygotyczności, którego należałoby oczekiwać w populacji będącej w równowadze Herdy’ego-Weiberga;
- **efektywna wielkość populacji (N_e)** – liczebność idealnej populacji, złożonej z osobników o jednakowym sukcesie rozrodczym, która podlega dryfowi genetycznemu w takim samym stopniu, jak rzeczywista populacja o liczebności N ;
- **współczynnik inbredu (F_{IS})** – w przypadku gatunków diploidalnych prawdopodobieństwo, że osobnik ma w określonym *locus* dwa allele, które niedawno oddzieliły się od tego samego przodka;
- **ogólny współczynnik inbredu (F_{IT})** – współczynnik, który porównuje heterozygotyczność osobnika do całej badanej populacji;
- **współczynnik utrwalenia (F_{ST})** – prawdopodobieństwo, że dwie losowo wybrane gamety, pochodzące z tej samej subpopulacji, będą miały identyczne pochodzenie, w odniesieniu do gamet wybranych w całej populacji (jeden z najpopularniejszych wskaźników genetycznego zróżnicowania między populacjami);
- **współczynnik G_{ST}** – odpowiednik F_{ST} , gdy w danym *locus* są tylko dwa allele lub średnia ważona wartości F_{ST} dla wszystkich alleli, gdy w *locus* są więcej niż dwa allele;
- **współczynnik R_{ST}** – analog F_{ST} zakładający model mutacji stopniowych i w niektórych przypadkach bardziej odpowiedni niż F_{ST} do szacowania zróżnicowania między populacjami na podstawie markerów mikrosatelitarnych.

Do analizy zmienności organizmów można stosować: markery morfologiczne (cechy fenotypowe, których ekspresja umożliwia ocenę sposobu dziedziczenia), markery cytologiczne (bazują na obserwacji aberracji chromosomowych w genomie danego organizmu i umożliwiają m.in. ocenę poziomu ploidalności, czy też analizę transferu genów), markery białek strukturalnych oraz białek enzymatycznych (analiza polimorfizmu struktury molekularnej polipeptydów mogących pośrednio odzwierciedlać zmienność materiału genetycznego), czy wreszcie systemy markerów molekularnych (ujawniają zmienność sekwencji nukleotydowej DNA) (SZTUBA-SOLIŃSKA 2005), które szczegółowo zostaną omówione w kolejnym podrozdziale.

I.7.1. MARKERY MOLEKULARNE

Marker genetyczny to polimorficzne cechy jakościowe organizmu, które charakteryzuje proste dziedziczenie mendlowskie, oraz które można zidentyfikować metodami analitycznymi. Z kolei, polimorfizm to całokształt różnic występujących między poszczególnymi gatunkami, odmianami, osobnikami, a także komórkami organizmu, które mogą być ujawniane dzięki odpowiednio dobranemu systemowi markerów. Za polimorfizm uznawana jest zmiana w sekwencji nukleotydów, występująca w populacji z częstością większą niż 1%. Polimorfizm może dotyczyć zarówno pojedynczego nukleotydu, jak i dłuższej, powtarzającej się wielokrotnie określonej sekwencji (FREELAND 2008; NOWAK, GRUSZCZYŃSKA 2007; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005).

Różnorodność genetyczna powstaje dzięki procesom rekombinacji i mutacji. Pomimo, że mechanizm powstawania zmian polimorficznych i mutacji jest identyczny, to różnica między nimi polega na częstości występowania (polimorfizm występuje częściej) oraz na konsekwencjach zmiany w odniesieniu do polipeptydu i cech genotypowych (poważniejsze w przypadku mutacji). Wykrycie konkretnej zmiany polimorficznej, pomimo że sama nie powoduje zmian genotypowych, może zmienić ją w marker genetyczny, informujący o przynależności do populacji, czy gatunku (FREELAND 2008; NOWAK, GRUSZCZYŃSKA 2007).

Dwoma głównymi kategoriami markerów molekularnych są markery kodominujące i dominujące. Dzięki zastosowaniu markerów kodominujących możliwa jest identyfikacja wszystkich alleli znajdujących się w *locus*. Markery kodominujące umożliwiają badaczowi rozróżnienie homo- i heterozygot. Markery dominujące z kolei, ujawniają jedynie dominującą formę alleliczną – nie można rozróżnić homo- i heterozygot. Wykorzystanie markerów dominujących ma jednak swoje zalety – jest mniej czasochłonne niż wykorzystywanie markerów kodominujących i może stanowić wygodniejszy sposób zdobywania informacji. Do markerów kodominujących należą np.: allozomy, RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), SNP (ang. *single nucleotide polymorphism* – polimorfizm pojedynczych nukleotydów) i mikrosatelity (SSR, ang. *simple sequence repeats* – proste powtórzenia sekwencji / STR, ang. *short tandem repeats* – krótkie powtórzenia tandemowe). Natomiast do markerów dominujących należą: RAPD (ang. *random amplification of polymorphic DNA* – losowo amplifikowany polimorficzny DNA) i AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism* – polimorfizm długości amplifikowanego fragmentu) (AVISE 2008; FREELAND 2008).

Do najczęściej stosowanych systemów markerowych należą metody: RFLP, RAPD, AFLP, SNP, sekwencje mikrosatelitarne i SSCP (ang. *single strand conformation polymorphism* – polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA) (AVISE 2008; FREELAND 2008; PILOT I IN. 2005; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005). Poza wyżej wspomnianymi systemami markerowymi stosowane są także do badania polimorfizmu m.in.: allozimy, sekwencje SINE, HAPSTR, SNPSTR, ISSR, STS, SCAR, ASA-PCR, PCR-ACRS, analiza heterodupleksów, SAMPL, DGGE, TGGE, pyrosequencing, czy wreszcie analiza sekwencji DNA (AGARWAL I IN. 2008; AVISE 2008; FREELAND 2008; PILOT I IN. 2005; RASZKA I IN. 2009; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005). W kolejnym rozdziale została omówiona metoda AFLP, którą wybrano do przeprowadzenia badań genetycznych roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych.

I.7.2. AFLP – POLIMORFIZM DŁUGOŚCI AMPLIFIKOWANYCH FRAGMENTÓW

Metoda AFLP, czyli polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (ang. *amplified fragment length polymorphism*) należy do wspólnej grupy metod tzw. „genetycznego odcisku palca”. AFLP polega na trawieniu matrycowego DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie poddaniu uzyskanych fragmentów DNA dwukrotnie amplifikacji: niespecyficznej i specyficznej (VOS I IN. 1995). Polimorfizm dotyczy różnic w długości amplifikowanych fragmentów, które powstają na skutek substytucji nukleotydowych w obrębie albo w pobliżu miejsc restrykcyjnych lub na skutek delecji lub insercji. Większość tego polimorfizmu jest dominująca (AVISE 2008).

Enzymy restrykcyjne przecinają dwuniciową cząsteczkę DNA w taki sposób, że jedna z nici jest dłuższa od drugiej o jeden lub dwa nukleotydy – są to tzw. „lepkie końce”. Enzymy restrykcyjne różnią się częstością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych. Pierwszy enzym trawi DNA z małą częstością np. *EcoRI* (rozpoznaje sekwencje GAATTC), drugi natomiast z dużą np. *MseI* (rozpoznaje sekwencje TTAA). Enzym, który trawi DNA z dużą częstością generuje małe fragmenty DNA. Fragmenty generowane przez enzymy *EcoRI* i *MseI* to fragmenty: *MseI* – *MseI* (powstaje ich najwięcej), *EcoRI* – *MseI*, *EcoRI* – *EcoRI* (powstaje ich najmniej). Warto zaznaczyć, że w końcowych etapach AFLP to głównie fragmenty *EcoRI* – *MseI* są amplifikowane. Ponadto, gdy badany genom posiada więcej niż 65% par G-C to enzym *MseI* nie generuje znaczącej liczby fragmentów – optymalne rezultaty otrzymuje się przy zawartości G-C mniejszej niż 50%. W przypadku enzymu restrykcyjnego *EcoRI* wydajność reakcji również jest większa przy mniejszej zawartości zasad G-C. W następnym etapie, do lepkich końców przyłączane są (ligowane) adaptory, czyli krótkie fragmenty DNA, komplementarne do jednoniciowego fragmentu przeciętej przez enzym cząsteczki DNA. W ten sposób powstaje grupa fragmentów DNA, które są zakończone identycznymi sekwencjami. Wykorzystując technikę PCR i odpowiednio dobrane startery komplementarne do sekwencji adaptorów można amplifikować wybraną grupę fragmentów DNA. Specyficzność reakcji jest zazwyczaj zwiększana poprzez dodanie od jednej do trzech par zasad na jednym z końców startera. Zatem, po ligacji adaptorów prowadzona jest reakcja preamplifikacji z zastosowaniem starterów komplementarnych do adaptorów i miejsca restrykcyjnego, posiadających na końcu 3' selektywny nukleotyd. Po reakcji amplifikacji niespecyficznej prowadzi się amplifikację specyficzną z użyciem starterów, które na końcu 3'

posiadają 2–4 specyficzne nukleotydy. W ten sposób powstają liczne fragmenty DNA, które tworzą na żelu poliakrylamidowym (detekcja poprzez barwienie srebrem, bądź autoradiograficznie) serię prążków różnej długości lub w przypadku elektroforezy kapilarnej (detekcja z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych) serię pików (AGARWAL I IN. 2008; BLIGNAUT I IN. 2013; FREELAND 2008; MATTHES I IN. 1998; PAPA I IN. 2005; STEFANOWICZ-HAJDUK 2008; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005; VEKEMANS I IN. 2002; VOS I IN. 1995; WOLFE, LISTON 1998). Metodę AFLP charakteryzuje wysoka rozdzielczość generowanych wzorów prążkowych (/pików) oraz możliwość szybkiej detekcji polimorfizmu. Ponadto system ten nie wymaga znajomości badanych sekwencji (FREELAND 2008; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005). Schemat całej procedury AFLP przedstawiono na FIGURZE 6.

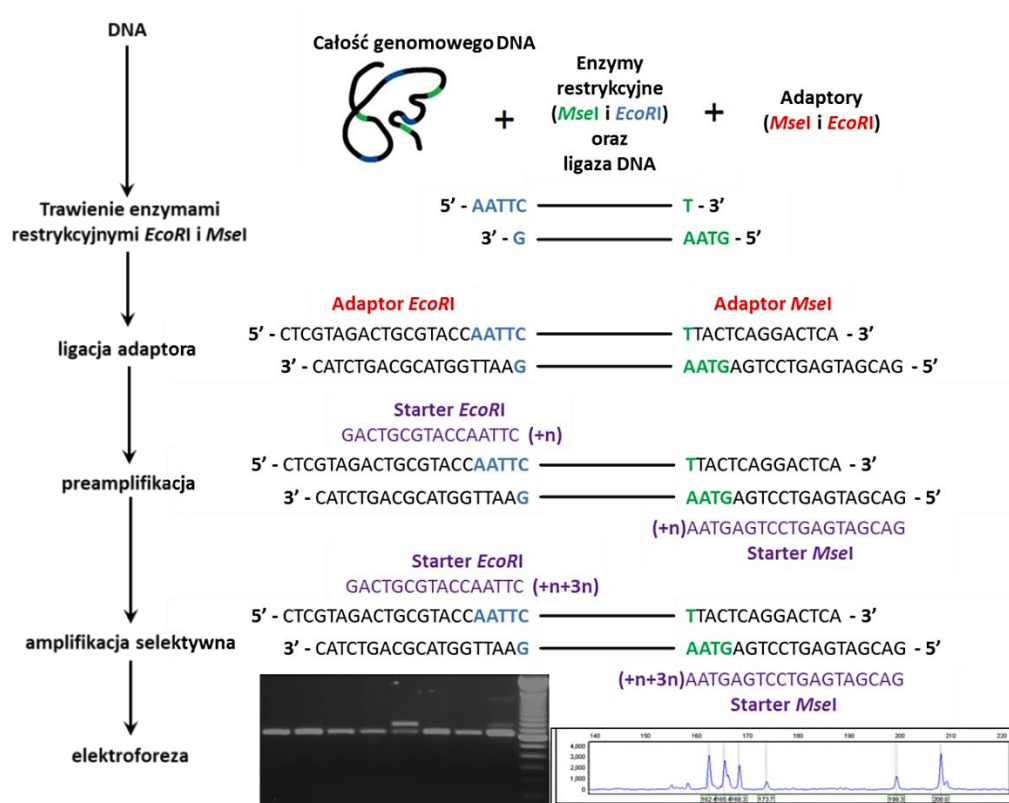


FIGURA 6. Schemat przedstawiający sposób analizy genotypów metodą AFLP (wykonanie własne w oparciu o: BLIGNAUT I IN. 2013; FREELAND 2008; MUELLER, WOLFENBARGER 1999; WASSOM, TRANEL 2005).

Metoda AFLP znalazła zastosowanie między innymi w różnorodnych analizach genomowych i w medycynie sądowej, wymagających dużej liczby polimorficznych, niesprzężonych cech jakościowych. Technika ta może znaleźć zastosowanie także przy ocenie pokrewieństwa pomiędzy osobnikami na podstawie dużej liczby *loci*, gdy markery dominujące można odpowiednio przeanalizować (AVISE 2008; HARDY 2003; MUELLER, WOLFENBARGER 1999). Metoda AFLP była ponadto wielokrotnie stosowana m.in. w badaniach dotyczących zróżnicowania genetycznego oraz szeroko pojętej ekologii populacyjnej różnych gatunków roślin (ABRATOWSKA I IN. 2012; ALARCÓN I IN. 2012; BARCACCIA I IN. 1999; BECKER, ALBERS 2009; CERVERA I IN. 2002; ERNST I IN. 2013; KUTA I IN. 2014; MICHALSKI I IN. 2010; MICHALSKI, DURKA 2012; RONKIER I IN. 2008; STEFANOWICZ-HAJDUK 2008; WASSOM, TRANEL 2005; WĄSOWICZ I IN. 2014).

II. CELE PRACY

Głównym celem badań było sprawdzenie rangi taksonomicznej nowo odkrytej formy (biotypu) gatunku *Geranium robertianum* L., porastającej tory kolejowe w północno-wschodniej Polsce (miejscowość Waliły-Stacja) i opisanej po raz pierwszy przez WIERZBICKĄ I IN. (2014). Dla osiągnięcia tego celu przeprowadzono badania, które miały odpowiedzieć na następujące pytania:

- W jakim stopniu dywergencja pomiędzy populacjami *G. robertianum* występującymi na torach kolejowych i populacjami zlokalizowanymi w lasach znajduje odzwierciedlenie w ich zróżnicowaniu fenotypowym i genetycznym?
- W jakim stopniu nowa forma *G. robertianum* jest powszechna na torach kolejowych w północno-wschodniej Polsce?
- Na czym polegają przystosowania roślin *G. robertianum* z populacji torowych do niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych, takich jak: insolacja, niedobór wody oraz stosowanie herbicydów?
- Co mogło być czynnikiem selekcyjnym, który spowodował wyodrębnienie się nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach-Stacji?
- Czy nowo odkryta forma *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym istotnie różni się od roślin z innych populacji tego gatunku?

Dzięki przeprowadzonym badaniom było możliwe zdobycie nowej wiedzy na temat początkowych etapów mikroewolucji roślin na siedliskach antropogenicznych oraz kształtowania się wzorców struktury i różnorodności genetycznej pod wpływem działania doboru naturalnego.

III. MATERIAŁY I METODY

III.1. OBIEKT BADAŃ I MIEJSCE BADAŃ

Obiektem badań były rośliny gatunku *Geranium robertianum* L. z rodziny bodziszkowatych (Geraniaceae Juss.). Miejscem występowania badanych populacji *G. robertianum* była linia kolejowa nr 37 Białystok – Zubki Białostockie (populacje torowe) i bezpośrednie okolice tej linii (populacje leśne), zlokalizowana w północno-wschodniej Polsce (FIG. 7, 8). W sumie przebadano 21 populacji *G. robertianum* występujących na torach kolejowych oraz 16 populacji występujących w lasach. Poza populacjami z północno-wschodniej Polski w badaniach wykorzystano także populacje leśne *G. robertianum* wyhodowane z nasion zebranych w:

- grądzie, w zachodniej części miasta Lyon we Francji (przy Hotelu Valpre);
- lesie liściastym na Słowacji, między miejscowościami Bodružal a Prikra;
- Kampinoskim Parku Narodowym (bór mieszany idący w kierunku grądu, w pobliżu obszaru ochrony ścisłej „Sieraków”¹).

Linie kolejową Białystok – Żednia – Waliły – Baranowicze – Wołkowysk otwarto 5 grudnia 1886 r. Stanowiła ona równoleżnikowe połączenie linii warszawsko-petersburskiej z warszawsko-moskiewską. Po 1945 r. linia Białystok-Wołkowysk została przecięta granicą państwową, a jej ranga spadła do roli lokalnej – stała się linią uzupełniającą. Długość linii nr 37 Białystok – Zubki Białostockie wynosi 47,087 km. W 1987 r. dokonano dużego remontu torowiska na odcinku Białystok Fabryczny – Zubki Białostockie (obecna linia kolejowa nr 37). Wymieniono podkłady na strunobetonowe i położono szyny bezстыkowe. Dnia 2 kwietnia 2000 r. zamknięto linię kolejową nr 37 dla transportu osobowego na trasie Białystok – Zubki Białostockie. Linią odbywał się jedynie transport towarowy do stacji Waliły, który został zakończony 10 grudnia 2012 r. (WIERZBICKI 2013). W 2016 r. przywrócono czasowo (02.07-09.10.2017 r.), w weekendy transport osobowy na trasie Białystok-Waliły. Również w 2017 r. kursował tzw. weekendowy pociąg do Puszczy Knyszyńskiej na trasie Białystok-Waliły w okresie czerwiec-październik. Jednak, nie wiadomo, czy transport pasażerski zostanie na linii nr 37 przywrócony na stałe (Banach 2016A, B; Rynek Kolejowy 2017; Wrota Podlasia 2016A, B).

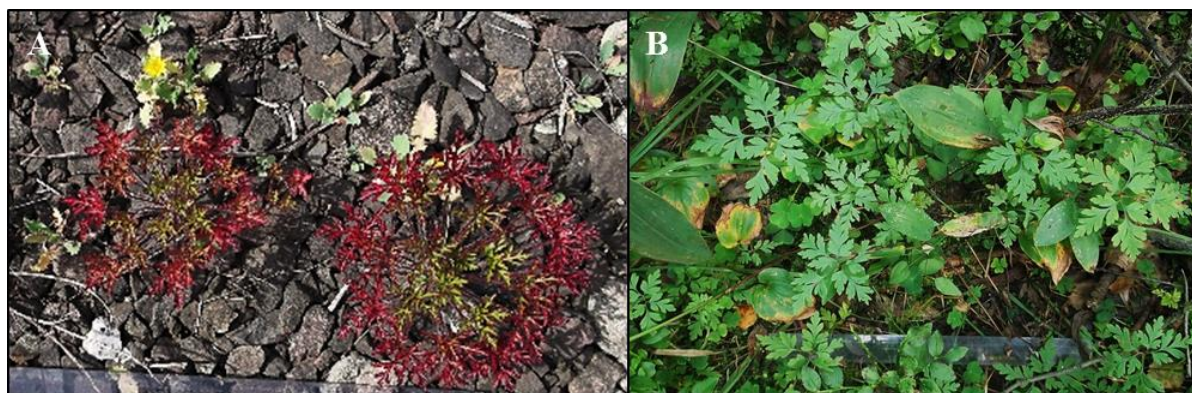


FIGURA 7. Wygląd roślin *G. robertianum* z populacji: torowej (A); leśnej (B).

¹ Nasiona oraz liście i całe osobniki *G. robertianum* w Kampinoskim Parku Narodowym zbierano do hodowli, zielnika i badań molekularnych za zgodą władz Parku w oparciu o porozumienie nr DE 0604/34/13.

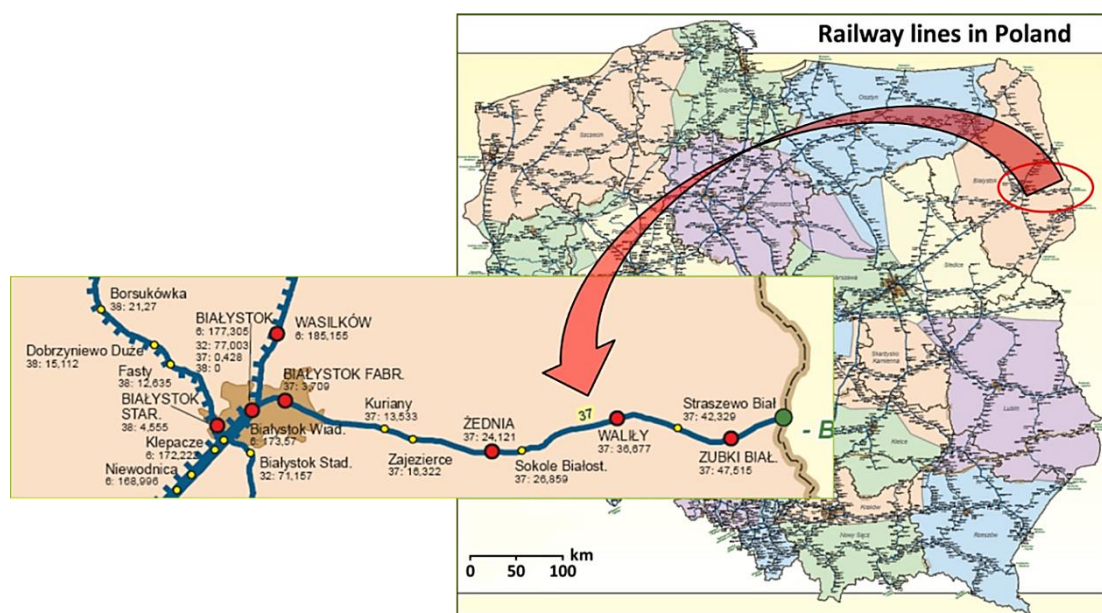


FIGURA 8. Linia kolejowa nr 37 Białystok – Zubki Białostockie, na której prowadzono badania w ramach niniejszej dysertacji (wykonanie własne w oparciu o: PKP POLSKIE LINIE KOLEJOWE S.A. 2016).

III.2. PRACE TERENOWE

W ramach przeprowadzonych prac terenowych wybrano do badań populacje roślin *G. robertianum* występujące na torach kolejowych i w lasach, na badanym obszarze. Opisano miejsca występowania roślin *G. robertianum* oraz zaznaczono wszystkie lokalizacje w GPS. W dalszej kolejności zebrano nasiona z wybranych populacji torowych i leśnych *G. robertianum* do dalszej hodowli roślin w szklarni. Zebrano także liście i całe okazy roślin do zielnika z różnych populacji *G. robertianum* oraz wykonano dokładną dokumentację fotograficzną. Próbkę do badań molekularnych (liście) z populacji torowych i leśnych *G. robertianum* zebrano z całego badanego obszaru. Ponadto, przeprowadzono badania biometryczne roślin *G. robertianum* z wybranych populacji torowych i leśnych oraz w wybranych punktach wykonano pomiar natężenia światła.

III.2.1. BADANIA BIOMETRYCZNE ROŚLIN WYKONANE W TERENIE

W terenie przeprowadzono badania biometryczne roślin *G. robertianum* z 16 wybranych populacji torowych oraz 13 populacji leśnych. W terenowych badaniach biometrycznych wykorzystano następujące populacje torowe, zlokalizowane wzdłuż całej linii nr 37 Białystok – Zubki Białostockie: BF, B1, B-Z2, L-Zaj, Zed, Sok, W-SB7A, W-SB6C, Wal1, Wal2, Wal3, W-S3, W-S3C, St-ZB, ZB i ZB-P1. Badaniom biometrycznym poddano także populacje leśne zlokalizowane w pobliżu linii nr 37: B-Z-Las1, Sob-Las1, Zaj-Las, Zed-Las1, Sok-Las1, Wal-Las, Gr-Las1, Gr-Las2, Grzyb-Las1, Kro-Las1, ZB-Las1, ZB-Las2, oraz dodatkowo, jako punkt odniesienia populację leśną z Kampinoskiego Parku Narodowego – o akronimie KPN1. Lokalizacja populacji wykorzystanych w badaniach terenowych została przedstawiona na FIGURZE 9. Opis wszystkich populacji wykorzystanych do badań i ich oznaczenia przedstawiono w TABELI 4, w rozdziale IV.1. Terenowe badania biometryczne przeprowadzono w następujących terminach: koniec lipca – początek sierpnia 2013 r. oraz maj 2014 r.

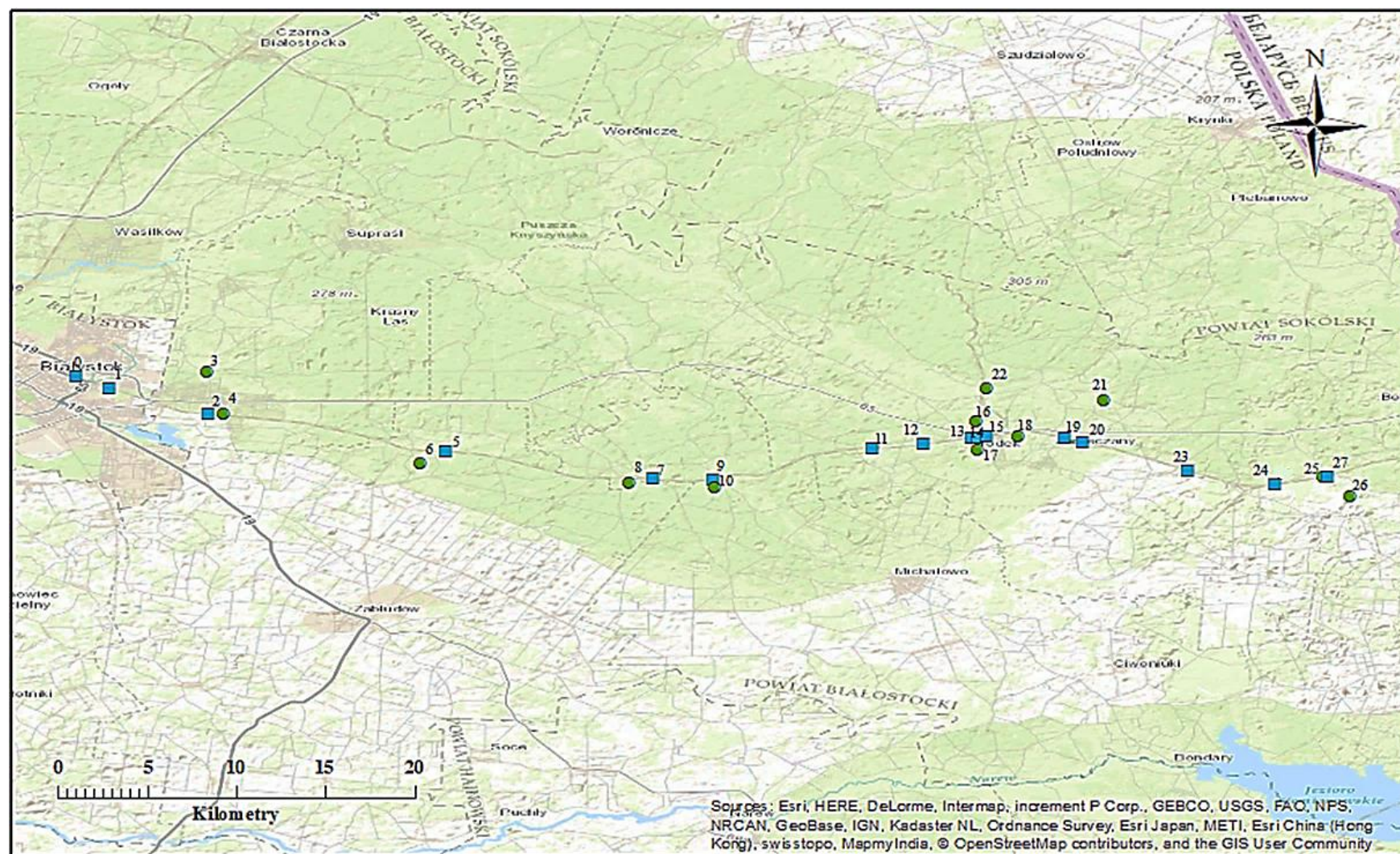


FIGURA 9. Mapa przedstawiająca lokalizację w północno-wschodniej Polsce torowych i leśnych populacji *G. robertianum*, które zostały wykorzystane do badań terenowych. Symbole populacji: BF [0], B1 [1], B-Z2 [2], B-Z-Las1 [3], Sob-Las1 [4], L-Zaj [5], Zaj-Las [6], Zed [7], Zed-Las1 [8], Sok [9], Sok-Las1 [10], W-SB7A [11], W-SB6C [12], Wal1 [13], Wal2 [14], Wal3 [15], Wal-Las [16], Gr-Las1 [17], Gr-Las2 [18], W-S3 [19], W-S3C [20], Grzyb-Las1 [21], Kro-Las1 [22], St-ZB [23], ZB [24], ZB-Las1 [25], ZB-Las2 [26] i ZB-P1 [27]. Oznaczenia: ● populacje leśne; ■ populacje torowe. Na mapie nie przedstawiono populacji leśnej KPN1.

Do pomiarów biometrycznych wykorzystano jedynie dorosłe osobniki *G. robertianum*. Zbadano cechy morfologiczne z losowo wybranych 20 osobników z danej populacji (jedynie w populacji Wal1 i B-Z-Las1 wzięto do badań mniej roślin – odpowiednio 15 i 10, ze względu na niewielką liczbę osobników). Policzono liczbę liści rozetowych u każdego osobnika w danej populacji. Oceniono wielkość rozet roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. Zastosowano podział na rośliny z rozetami:

- bardzo dużymi (wysokość rośliny: ~25-30 cm; rozpiętość liści: ~30-40 cm),
- dużymi (wysokość rośliny: ~20 cm; rozpiętość liści: ~25 cm),
- średnimi (wysokość rośliny: ~15 cm; rozpiętość liści: ~20 cm),
- małymi (wysokość rośliny: ~10 cm; rozpiętość liści: ~15 cm),
- bardzo małymi (wysokość rośliny: ~5 cm; rozpiętość liści: ~10 cm).

Uzyskany wynik przedstawiono jako % roślin z poszczególnych populacji torowych i leśnych o rozetach danej wielkości. Oceniano także kolor blaszek liściowych u roślin *G. robertianum*. Wykonano opis siedlisk i miejsc występowania badanych roślin. Na koniec przeprowadzono dokumentację fotograficzną każdej populacji, poszczególnych osobników oraz otoczenia.

W trakcie badań terenowych zebrano do zielnika okazy całych osobników *G. robertianum* z poszczególnych populacji oraz zebrano po 10 liści z trzech reprezentatywnych osobników z danej populacji (w sumie po 30 liści). Liście te posłużyły do wykonania pomiaru długości, szerokości blaszek liściowych (FIG. 10) oraz do pomiaru powierzchni liści – w programie WinFOLIA Pro V 2007b (WINFOLIA 2007).

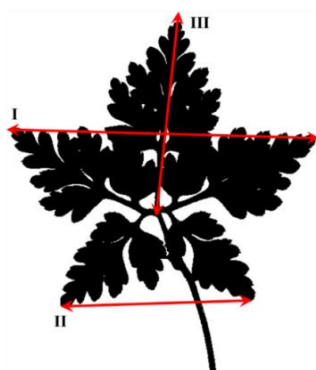


FIGURA 10. Schemat przedstawiający pomiar szerokości blaszek liściowych roślin *G. robertianum* w dwóch miejscach (I i II) oraz długości blaszki liściowej (III).

III.2.2. POMIARY NATĘŻENIA ŚWIATŁA W TERENIE

W ramach badań terenowych przeprowadzono pomiar natężenia światła w pięciu wybranych lokalizacjach populacji torowych *G. robertianum* (Wal-St-napis, Wal-St-rampa, Sok, L-Zaj, BZ-2) na linii kolejowej nr 37 oraz w czterech wybranych lokalizacjach populacji leśnych (Gr-Las1, Wal-Las, Zaj-Las, Sob-Las1), zlokalizowanych w północno-wschodniej Polsce. Pomiary prowadzono w słoneczny dzień, w godzinach popołudniowych (między godziną 12:00 a 15:00), w połowie sierpnia 2016 r. Pomiary prowadzono luksometrem Digital Lux Meter LX1010B. Pomiarów natężenia światła dokonano na wysokości około 30 cm, co odpowiadało wysokości rozet *G. robertianum*.

III.3. BADANIA ROŚLIN WYHODOWANYCH W SZKLARNI

W niniejszym rozdziale przedstawiono, jak wyglądały kolejne etapy hodowli roślin *G. robertianum* wykorzystanych w badaniach laboratoryjnych. Nasiona *G. robertianum* zebrane z roślin rosnących na badanym obszarze przechowywano w kopertach, w suchym miejscu, w temperaturze pokojowej. Z nasion tych wyhodowano rośliny potomne.

III.3.1. TESTY KIELKOWANIA NASION

Przed rozpoczęciem hodowli roślin wykonano testy kielkowania nasion. Testy prowadzono na szalkach Petriego. Nasiona *G. robertianum* z poszczególnych populacji umieszczano na potrójnej warstwie bibuły filtracyjnej i dodawano wodę destylowaną (początkowo po 5 ml, w kolejnych dniach po 0,5-3 ml wody w zależności od potrzeb). Szalki z nasionami umieszczano w kontrolowanych warunkach w fitotronie. W kolejnych dniach trwania testu zliczano ilość wykiełkowanych nasion. W celu uniknięcia porażenia nasion pleśnią, wszystkie naczynia i narzędzia wykorzystywane do testów kielkowania były czyszczone etanolem a następnie przepłukiwane wodą destylowaną.

Przed rozpoczęciem właściwych testów kielkowania nasion, przeprowadzono badania wstępne w celu wybrania odpowiedniej metodyki hodowli roślin. Wykazano, że w przypadku większości populacji, nasiona *G. robertianum* najlepiej kiełkują kiedy przed wysiewem nasiona zostawi się na 24h w wodzie destylowanej. Optymalna temperatura kielkowania nasion wynosi 22°C. Zastosowanie stratyfikacji termicznej przed wysianiem nasion osłabiło siłę kielkowania nasion. Zastosowane metody sterylizacji nasion nie zmniejszyły procentu nasion porażonych pleśnią (nasiona płukano przez określony czas w wodnych roztworach etanolu i preparatu Clorox o wzrastającym stężeniu, a następnie dokładnie spłukiwano wodą destylowaną). Rośliny lepiej kiełkowały na szalkach Petriego niż w glebie ogrodniczej.

Główne testy kielkowania nasion wykonano zgodnie z ustaleniami metodycznymi z badań wstępnych. Nasiona umieszczano przed rozpoczęciem danego testu na 24h w wodzie destylowanej. Nie stosowano sterylizacji nasion, ani żadnych innych zabiegów. Wszystkie nasiona kiełkowały w temperaturze 22°C. Testy prowadzono na szalkach Petriego. W poszczególnych testach wysiewano od 40 do 300 nasion. Testy trwały od 14 do 20 dni w zależności od tempa kielkowania nasion. W sumie sprawdzono siłę kielkowania nasion z 16 populacji torowych oraz 8 populacji leśnych (większość nasion zebrano w sezonie wegetacyjnym w 2013 r.). W tym, przetestowano nasiona z populacji torowej z Walił-Stacji i populacji leśnej z Zajezierec zebrane w różnych latach – 2008 r., 2013-2015 r.

III.3.2. HODOWLA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Do pierwszego etapu badań rośliny wyhodowano z nasion populacji torowych: BF, B1, B-Z2, L-Zaj, W-SB7A, W-SB6C, Wal1, Wal2, Wal3, W-S3, W-S3C i ZB, oraz populacji leśnych: Zaj-Las, Wal-Las, KPN, Słowacja i Francja, które zebrano w okresie lipiec – wrzesień 2013 r. Wykorzystano także nasiona populacji torowej Wal-St (2008) oraz populacji leśnej Zaj-Las (2008), których nasiona były zebrane w 2008 r. Do drugiego etapu badań

wykorzystano nasiona populacji torowych z miejscowości Waliły-Stacja: Wal-St (2008), Wal3 (2013), Wal3 (2014), Wal-St-rampa (2015), Wal-St-napis (2015), oraz populacji leśnych z lasu za wsią Zajezerce: Zaj-Las (2008), Zaj-Las (2013), Zaj-Las (2014) i Zaj-Las (2015). Nasiona z 2013 r. zbierano w okresie lipiec – wrzesień, nasiona z 2014 r. zbierano w maju, a nasiona z 2015 r. zbierano w sierpniu. W nawiasie podano rok, w którym pozyskano nasiona do hodowli. Opis wszystkich populacji wykorzystanych do badań i ich oznaczenia przedstawiono w TABELI 4, w rozdziale IV.1.

Hodowle roślin *G. robertianum* rozpoczynano wysiewając nasiona na szalkach Petriego. Na potrójnej warstwie bibuły filtracyjnej, umieszczano po 50 nasion roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji i dodawano po około 5 ml wody destylowanej (w zależności od potrzeb). Szalki z nasionami trzymano w kontrolowanych warunkach w fitotronie (dzień: 22°C przez 16h i noc: 20°C przez 8h). Nasiona a potem siewki hodowano w fitotronie do 20-30 dni od daty wysiania nasion (FIG. 11), następnie siewki przesadzano do palet rozsadowych (tzw. wielodoniczek), do gleby ogrodniczej (FIG. 12A).

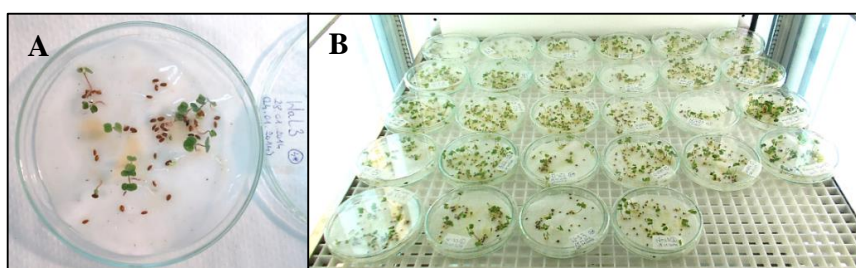


FIGURA 11. Szalki Petriego z nasionami roślin *G. robertianum*, hodowane w fitotronie (A, B).



FIGURA 12. Rośliny *G. robertianum* hodowane w szklarni: rośliny w paletach rozsadowych (A); rośliny w małych doniczkach (B); rośliny w dużych doniczkach (C).

Palety rozsadowe wraz z siewkami przenoszono do szklarni (FIG. 12A) i tam hodowano rośliny przez około 1-1,5 miesiąca w zależności od tempa ich wzrostu. Około dwumiesięczne rośliny przesadzano do małych doniczek (FIG. 12B). Rośliny *G. robertianum* w wieku około 3-3,5 miesiąca przesadzano do dużych doniczek, w których znajdowały się już do końca uprawy (FIG. 12C). Rośliny rosły w szklarni w temp. $+25\pm 5^{\circ}\text{C}$ i przy wilgotności $50\pm 15\%$. W miesiącach zimowych korzystano ze sztucznego doświetlania przez 8 godz. w dzień. Do hodowli roślin wykorzystywano glebę ogrodniczą – podłoże Uniwersalne firmy SUBSTRAL. W trakcie hodowli rośliny regularnie podlewano i nawożono preparatem Florovit.

III.3.3. BADANIA BIOMETRYCZNE ROŚLIN WYHODOWANYCH W SZKLARNI

Przeprowadzono badania biometryczne roślin *G. robertianum* z 16 wybranych populacji torowych oraz 8 populacji leśnych, hodowanych w szklarni w jednakowych warunkach. Badania biometryczne podzielono na dwa etapy. W pierwszym etapie badań porównywano rośliny *G. robertianum* z różnych populacji torowych i leśnych. Do drugiego etapu badań wybrano rośliny *G. robertianum* z populacji torowej z Walił-Stacji i leśnej z Zajezierec, wyhodowanych z nasion zebranych w różnych latach (patrz rozdział: III.3.2). Do badań wykorzystano od 5 do 35 osobników z danej populacji. Dla każdej z populacji badania przeprowadzono dwukrotnie – gdy rośliny miały 3-3,5 miesiąca oraz gdy rośliny osiągnęły wiek 6-6,5 miesiąca.

W ramach badań biometrycznych oceniano wygląd roślin, policzono liczbę liści rozetowych u osobników w danej populacji oraz zmierzono długość ogonków liściowych – 5 (I pomiar) i 10 (II pomiar) największych liści. Dodatkowo dla roślin z populacji torowych z Walił oraz populacji leśnych z Zajezierec wykonano pomiar wysokości roślin oraz oceniano kolor grzbietowej i brzusznej strony blaszek liściowych z podziałem na liście najmłodsze, średnie i najstarsze. Zastosowaną skalę kolorystyczną przedstawioną na FIGURZE 13. Na FIGURZE 14 przedstawiono mapę z zaznaczonymi populacjami, z których pochodziły nasiona wykorzystane do badań biometrycznych.




1		jasnozielone
2		średniozielone
3		ciemnozielone
4		mocno ciemnozielone
5		zgniętozielone
6		lekko różowonabiegle
7		średnioróżowe
8		różowe
9		ciemnoróżowe

FIGURA 13. Skala kolorystyczna wykorzystana do oceny koloru grzbietowej i brzusznej strony blaszek liściowych roślin *G. robertianum*.

Ostatnim etapem badań biometrycznych było wykonanie pomiarów blaszek liściowych. W tym celu, zebrano po 5 liści z wybranych 10 osobników *G. robertianum* (w sumie 50 liści) w wieku około 6-6,5 miesiąca z danej populacji. Wykonano pomiary długości i szerokości blaszek liściowych w dwóch miejscach (FIG. 10), a także pomiar powierzchni liści w programie WinFOLIA Pro V 2007b (WINFOLIA 2007).

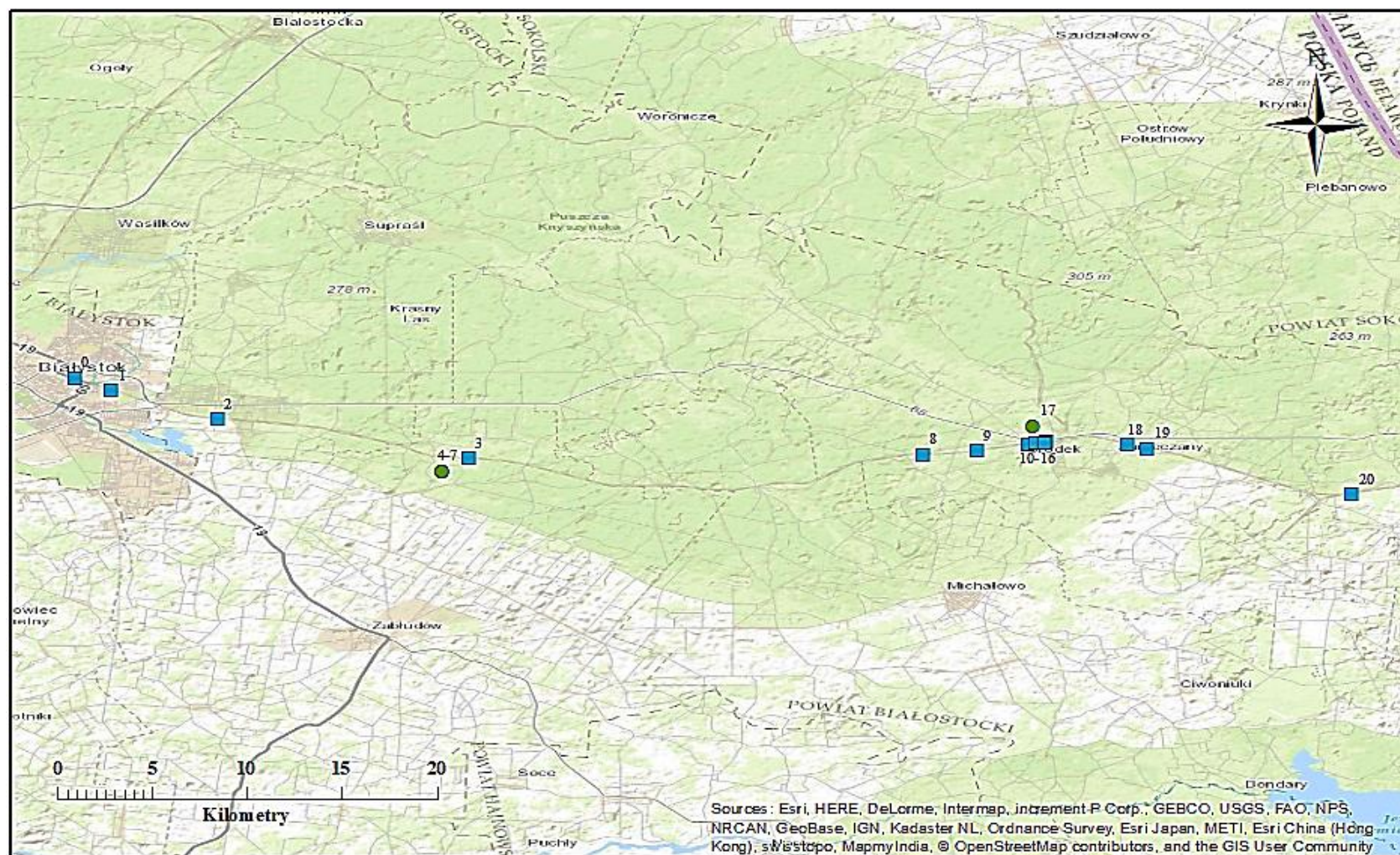


FIGURA 14. Mapa przedstawiająca lokalizację w północno-wschodniej Polsce torowych i leśnych populacji *G. robertianum*, których nasiona zostały wykorzystane do założenia hodowli szklarniowych. Symbole populacji i rok zbioru nasion: BF (2013) [0], B1 (2013) [1], B-Z2 (2013) [2], L-Zaj (2013) [3], Zaj-Las (2008, 2013-2015) [4-7], W-SB7A (2013) [8], W-SB6C (2013) [9], Wal-St (2008) [10], Wal1 (2013) [11], Wal2 (2013) [12], Wal3 (2013, 2014) [13, 14], Wal-St-napis (2015) [15], Wal-St-rampa (2015) [16], Wal-Las (2013) [17], W-S3 (2013) [18], W-S3C (2013) [19], ZB (2013) [20]. Oznaczenia: ● populacje leśne; ■ populacje torowe. Na mapie nie przedstawiono populacji leśnych: KPN1 (2013), Słowacja (2013) i Francja (2013).

III.3.4. POMIARY NATĘŻENIA ŚWIATŁA W SZKLARNI

W ramach badań prowadzonych w szklarni przeprowadzono pomiary natężenia światła. W szklarni wykonano 8 pomiarów w różnych punktach – na brzegach, oraz po środku stołów hodowlanych. Pomiary wykonano około 30 cm nad powierzchnią stołów, co odpowiadało wysokości rozet roślin *G. robertianum*. Pomiary prowadzono w okresie letnim, w słoneczny dzień, w godzinach przedpołudniowych (około godziny 11:30). Pomiary wykonano luksometrem Digital Lux Meter LX1010B.

III.3.5. POMIARY ZAWARTOŚCI ANTOCYJANÓW W ROŚLINACH *G. ROBERTIANUM*

W ramach badań porównywano zawartość antocyjanów w roślinach *G. robertianum* z wybranych populacji torowych i leśnych, hodowanych w szklarni w jednakowych warunkach. Ocenę zawartości antocyjanów wykonano dla blaszek i ogonków liściowych.

Wykonano badania wstępne mające na celu ustalenie metodyki do dalszych badań. Wynikiem była średnia zawartość antocyjanów z materiału roślinnego – z blaszek lub ogonków liściowych (świeża masa). Zbadano poziom antocyjanów dwoma metodami:

- 1) **Zmodyfikowana metoda wg FULEKI, FRANCIS (1968).** Do badań zebrano po 0,5 g materiału roślinnego z trzech roślin, z danej populacji. Materiał umieszczono w probówkach, homogenizowano (rozcierano przy pomocy szklanej bagietki) w 4 ml metanolu zakwaszonego HCl (1%) i pozostawiono na 4 godziny, w 4°C. Próbkę wirowano przez 30 minut przy 10 000 x g. Próbkę oznaczano spektrofotometrycznie (Shimadzu), długość fali $\lambda=530\text{nm}$ i 657nm . Analogicznie przygotowano ślepą próbę. Badanie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach a wyniki uśredniono. Zawartość antocyjanów w próbce wyliczono wg wzoru (FULEKI, FRANCIS 1968; WIERZBICKA I IN. 2014):

$$Z = \frac{16,7 \cdot (A_{530} - 0,25 \cdot A_{657}) \cdot V}{g} \text{ [ml/g]},$$

gdzie „V” to objętość zastosowanego ekstrahenta [ml], a „g” to świeża masa próbki [g].

- 2) **Metoda opisywana przez MANCINELLI I IN. (1988) oraz BIEZA, LOIS (2001).** Do badań pobierano porcje 50 mg materiału roślinnego z trzech roślin, z danej populacji. Materiał homogenizowano poprzez zanurzenie probówek z materiałem w ciekłym azocie a następnie roztarcie przy pomocy szklanej bagietki. Do próbek dodano po 500 μl 1% (o:o) HCl w metanolu i inkubowano przez noc. Następnego dnia do próbek dodawano 500 μl wody destylowanej oraz 1 ml chloroformu w celu usunięcia chlorofilu. Próbkę wirowano przez 5 minut przy 13 000 x g. Górną, wodną fazę wykorzystano do oznaczeń spektrofotometrycznych (Shimadzu), długość fali $\lambda=530\text{nm}$. Analogicznie przygotowano ślepą próbę. Badanie przeprowadzono w dwóch powtórzeniach a wyniki uśredniono. Względna zawartość antocyjanów wyrażono jako $A^{530} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FW}$ (BIEZA, LOIS 2001; LEI I IN. 2011; MANCINELLI I IN. 1988). Symbol „FW” oznacza fazę wodną.

Do dalszych badań nad zawartością antocyjanów w liściach roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych wybrano nowszą metodę opisywaną przez MANCINELLI I IN. (1988) oraz BIEZA, LOIS (2001).

W oparciu o metodę wybraną w ramach badań wstępnych (MANCINELLI I IN. 1988; BIEZA, LOIS 2001) przeprowadzono dwa główne doświadczenia. W obu doświadczeniach wykonano oddzielnie analizę dla blaszek i ogonków liściowych. Zastosowano po jednym powtórzeniu analiz dla danej rośliny. W obu doświadczeniach przygotowano trzy niezależne ślepe próby (bez materiału roślinnego). Ostatecznym wynikiem była średnia względna zawartość antocyjanów z materiału roślinnego (ogonek lub blaszka liściowa) pochodzącego z wybranych 10 roślin w danej populacji. W doświadczeniu I zbadano poziom antocyjanów w roślinach z czterech wybranych populacji torowych oraz dwóch populacji leśnych. W doświadczeniu II zbadano poziom antocyjanów w roślinach z populacji torowych z Walił-Stacji i leśnych z Zajezierec, wyhodowanych z nasion zebranych w różnych latach.

III.3.6. TOLERANCJA NA SUSZĘ ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Wykonano badania nad tolerancją na suszę dorosłych roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W tym celu przez 26 dni obserwowano rośliny z populacji torowych Wal-St (2008) i Wal3 (2014), oraz leśnej Zaj-Las (2014). Rośliny trzymano w szklarni, w temperaturze około 20-25°C. Po zaprzestaniu podlewania roślin rozpoczęto obserwacje. Badania prowadzono z podziałem na liście najmłodsze, średnie oraz najstarsze na roślinie. Zliczano liście: żywe, uschnięte, z chlorozami, z nekrozami i innymi zmianami.

III.3.7. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Przeprowadzono badania nad wpływem herbicydu Roundup na rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W ramach badań wykonano obserwacje makroskopowe całych roślin *G. robertianum* i ich liści, obserwacje liści w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym oraz obserwacje ultrastruktury liści w transmisyjnym i skaningowym mikroskopie elektronowym. Zbadano także zawartość glifosatu i jego głównego produktu rozkładu – AMPA w częściach nadziemnych roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych po oprysku herbicydem Roundup. Na koniec wykonano badania nad wpływem herbicydu Roundup na kwitnienie roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych.

III.3.7.1. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW HERBICYDU ROUNDUP

Do oprysku roślin we wszystkich doświadczeniach wykorzystano herbicyd Roundup Ultra 170 SL. Zawartość substancji czynnej – glifosatu w tym preparacie wynosi 170 g w 1 litrze środka (ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP ULTRA 170 SL). Na bazie herbicydu Roundup i wody destylowanej przygotowywano objętościowo roztwory wodne o odpowiednim stężeniu glifosatu w roztworze dla danego doświadczenia. W badaniach stosowano opryskiwacz ciśnieniowy firmy Hozelock, który umożliwia podanie określonej objętości herbicydu. Wariantami kontrolnymi we wszystkich doświadczeniach były rośliny nie poddane opryskom herbicydem.

III.3.7.2. PRZEPROWADZONE OBSERWACJE

W ramach badań nad wpływem herbicydu Roundup na rośliny *G. robertianum*, w poszczególnych doświadczeniach prowadzono obserwacje parametrów takich jak: liczba liści, kolor liści, obecność chloroz i nekroz, kondycja roślin, obecność liści uschniętych lub usychających. Odnotowywano także wszelkie inne zmiany w wyglądzie roślin.

Prowadzono dokumentację fotograficzną pokroju roślin *G. robertianum* oraz pojedynczych liści w różnym wieku roślin kontrolnych i po oprysku herbicydem. Wykonano obserwacje fragmentów liści pod binokulem wyposażonym w kamerę cyfrową i system analizy obrazu (NIS-Elements BR 3.0, Nikon). W wybranych doświadczeniach, wykonano obserwacje powierzchni blaszek liściowych oraz przekrojów przez blaszki liściowe roślin kontrolnych i po oprysku herbicydem w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym (Nikon EFD-3), aby zbadać fluorescencję chlorofilu na obszarach dotkniętych chlorozami.

III.3.7.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ W TEM

W ramach badań nad wpływem herbicydu Roundup na rośliny *G. robertianum* przeprowadzono obserwacje ultrastruktury komórek roślin w transmisyjnym mikroskopie elektronowym. Materiał roślinny we wszystkich doświadczeniach był przygotowywany do obserwacji w TEM według standardowej procedury (ANTOSIEWICZ, WIERZBICKA 1999; CIECIURA 1989; LITWIN 1999; WRÓBEL I IN. 2005). Do utrwalenia pobierano fragmenty liści roślin *G. robertianum* o rozmiarach 2 x 3 mm, wycięte ze środkowej części blaszki liściowej (FIG. 15). W zależności od doświadczenia były pobierane do badań liście w różnym wieku.



FIGURA 15. Schemat przedstawiający fragment liścia rośliny *G. robertianum* pobranego do utrwalania.

Utrwalanie fragmentów liści przeprowadzono w temperaturze pokojowej, według następującej procedury (ANTOSIEWICZ, WIERZBICKA 1999): utrwalenie wstępne – roztwór 2,5% aldehydu glutarowego (GA) 0,1 M w buforze kakodylanowym, o pH równym 7,2 (2h); płukanie w buforze kakodylanowym (3 x 10 minut); utrwalenie następne – roztwór 1% OsO₄ w buforze kakodylanowym (2h); płukanie w buforze kakodylanowym (3 x 10 minut). Utrwalony materiał odwadniano przy użyciu: mieszaniny wody z acetonem o wzrastającym stężeniu acetonu – 25%, 50%, 70%, 90%, 96% (po 15 minut każdy), czystego acetonu (2 x 20 minut), mieszaniny tlenu propylenu i acetonu 100% w stosunku objętościowym 1:1 v/v (20 minut) oraz czystego tlenu propylenu (2 x 20 minut). Po odwodnieniu materiał przesycano żywicą epoksydową Epon-Spurr w mieszaninie z tlenkiem propylenu – w stosunku objętościowym 1:3, 1:1, 3:1 v/v (po 2h każda) i czystą żywicą

epoksydową Epon-Spurr (2 x 2h). Wysycony materiał zatopiono w świeżej żywicy Epon-Spurr i pozostawiono do polimeryzacji w cieplarni, w temperaturze 60°C przez 24h (FIG. 16).



FIGURA 16. Fragmenty liści roślin *G. robertianum* umieszczone w mieszaninie tlenku propylenu z żywicą (A); wysycanie preparatów czystą żywicą epoksydową i umieszczanie w kształtkach (B); bloczki spolimeryzowanej żywicy z zatopionym materiałem roślinnym (C).

Bloczki spolimeryzowanej żywicy z materiałem roślinnym trzymowano używając żyletki. Preparaty półciennie o grubości 200-300 nm wykonywano przy użyciu noża szklanego na ultramikrotomie BS 490A (Tesla). Preparaty skrawano w przekroju poprzecznym (prostopadle do osi liścia). Skrawki umieszczano na szkiełku podstawowym, suszono na płycie grzewczej w temperaturze 58°C i barwiono błękitem toluidyny (1% roztwór barwnika w 1% roztworze wodnym boraksu, przez 15 sekund). Nadmiar barwnika spłukano wodą destylowaną i pozostawiono skrawki do wysuszenia (FIG. 17). Preparaty półciennie obserwowano pod mikroskopem świetlnym (EFD-3 firmy Nikon, wyposażony w kamerę cyfrową i system analizy obrazu – NIS-Elements BR 3.0, Nikon).

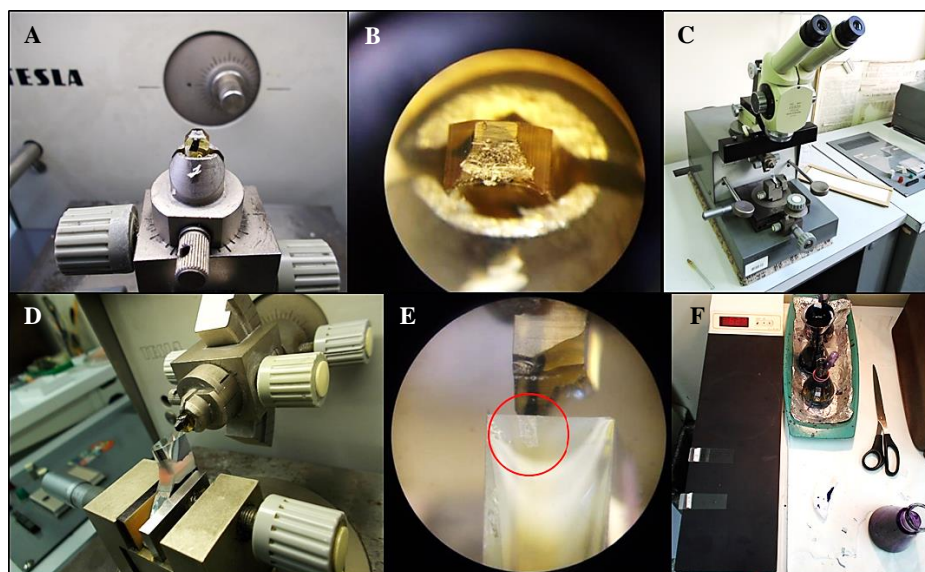


FIGURA 17. Trzymowanie bloczków spolimeryzowanej żywicy z materiałem roślinnym (A, B); wykonanie preparatów półciennych przy użyciu noża szklanego na ultramikrotomie (C, D, E); barwienie preparatów półciennych błękitem toluidyny i ich suszenie (F).

Preparaty ultracienkie o grubości 70-90 nm wykonano przy użyciu noża diamentowego na ultramikrotomie PowerTome XL (RMC Products, Boeckeler) i zbierano na siatki miedziane (zarówno pokryte formvarem, jak i bez formvaru). Grubość skrawków weryfikowano poprzez analizę barw interferencyjnych, które w przedziale 60–90 nm miały barwę szaro-złotą. Część preparatów kontrastowano octanem uranylu (1% roztwór w 70% etanolu, 20 minut) oraz cytrynianem ołowiu – tzw. odczynnik Reynolds'a (30 minut) (REYNOLDS 1963). Preparaty oglądano w transmisyjnym mikroskopie elektronowym BS 500 (Tesla) (FIG. 18) oraz JEM 1400 (JEOL Co., Japonia 2008).

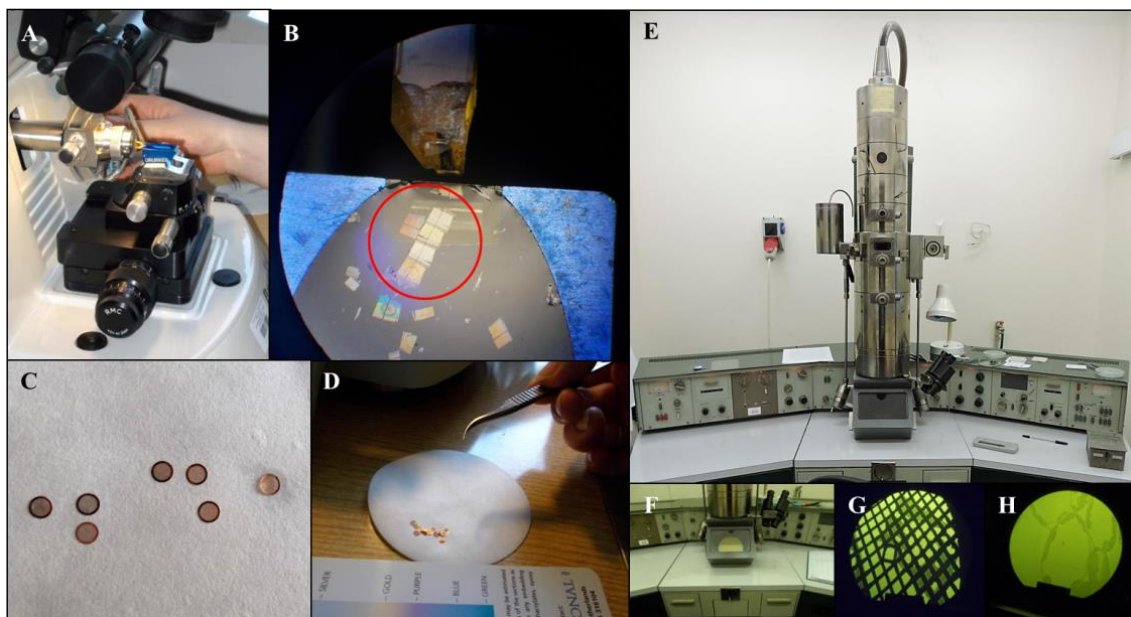


FIGURA 18. Przygotowanie preparatów ultracienkich przy użyciu noża diamentowego na ultramikrotomie i zebranie ich na siatki miedziane (A-D). Oglądanie preparatów ultracienkich w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (E-H).

III.3.7.4. BADANIA WSTĘPNE NAD REAKCJĄ ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* NA HERBICYD

Przed rozpoczęciem właściwych badań nad wpływem herbicydu Roundup na dorosłe rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych wykonano badania wstępne w celu:

- ustalenie metodyki do dalszych badań, w tym dawki herbicydu pozwalającej obserwować stopniowe zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne u badanych roślin (1);
- poznania reakcji na herbicyd roślin występujących na torach kolejowych, aby móc następnie porównać reakcję na herbicyd roślin z populacji torowych i leśnych (2).

USTALENIE METODYKI BADAŃ

Do badań wstępnych wykorzystano 2,5 miesięczne rośliny *G. robertianum* z populacji torowej W-SB6, wyhodowanych w szklarni. Do badań wykorzystano po dwie rośliny na wariant. Prowadzono przez dwa miesiące obserwacje morfologiczne oraz wykonano dokumentację fotograficzną dla następujących wariantów:

- Kontrola – rośliny, na których nie zastosowano oprysków środkiem Roundup;
- Oprysk 40 mg/l glifosatu, po 5 / 20 / 40 ml roztworu na roślinę (dawki: 200 / 800 / 1600 µg glifosatu);
- Oprysk 60 mg/l glifosatu, po 5 / 20 / 40 ml roztworu na roślinę (dawki: 300 / 1200 / 2400 µg glifosatu);
- Oprysk 1700 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę (dawka: 34 000 µg glifosatu).

Przeprowadzono także obserwacje struktury i ultrastruktury komórek liści roślin *G. robertianum* z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego i TEM. Do utrwalania pobierano fragmenty liści ze środkowych okółków rozet (liście w wieku około dwóch tygodni). Przebadano następujące warianty:

- Kontrola – rośliny, na których nie zastosowano oprysków środkiem Roundup;
- Oprysk 60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu na roślinę (2400 μ g glifosatu). Fragmenty liści utrwalono i pobrano do badań po 12h, 34h i 58h, od oprysku roślin herbicydem;
- Oprysk 1700 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę (34 000 μ g glifosatu). Fragmenty liści utrwalono i pobrano do badań po 32h od oprysku roślin herbicydem.

REAKCJA ROŚLIN Z POPULACJI TOROWYCH NA HERBICYD

Do badań wykorzystano 9 miesięczne rośliny *G. robertianum* z kilku populacji torowych (z początkowej i środkowej części linii kolejowej nr 37), wyhodowane w szklarni. Przez dwa miesiące prowadzono obserwacje morfologiczne oraz wykonano dokumentację fotograficzną. Wykonano obserwacje struktury i ultrastruktury komórek liści roślin *G. robertianum* z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego i TEM. W każdym wariancie badano po dwie rośliny. Liście, z których pobierano fragmenty do utrwalenia i obserwacji w TEM nie zrywano – oznaczono je etykietami, tak aby możliwa była ich lokalizacja i obserwacja zachodzących zmian. Wszystkie nowe liście pojawiające się na roślinach oznaczano co tydzień etykietami i obserwowano (do 50 dni).

Materiał z wariantów testowych do obserwacji w TEM pobierano w gradiencie czasowym: 3h, 12h, 42h, 1 tydzień i 2 tygodnie od oprysku. Zastosowano dwie dawki glifosatu: 40 mg/l oraz 60 mg/l po 40 ml roztworu na roślinę (1600 μ g i 2400 μ g glifosatu). Do badań pobrano fragmenty liści, które były najmłodsze w dniu oprysku (odpowiednio po: 3h – liście 1 dniowe, 12h – liście 2 dniowe, 42h – liście 3 dniowe, 1 tydzień – liście tygodniowe, 2 tygodnie – liście dwutygodniowe). Dodatkowo dla jednego z wariantów testowych (dawka: 60 mg/l po 40 ml roztworu glifosatu) oraz kontroli wprowadzono podział, ze względu na wiek liści i ich obecność na roślinach w dniu oprysku lub pojawienie się po oprysku (liście: jednodniowe, tygodniowe, dwutygodniowe oraz starsze niż dwa tygodnie) (FIG. 19). Fragmenty liści w różnym wieku, które pozostawiono na roślinach w celu dalszych obserwacji, utrwalono także po 34, 41 i 48 dniach od oprysku (odpowiednio liście: 35, 42 i 49 dniowe). Sprawdzano, czy ultrastruktura komórek liści podlega regeneracji wraz z czasem oraz, czy starzejące się liście po oprysku różnią się od kontroli.

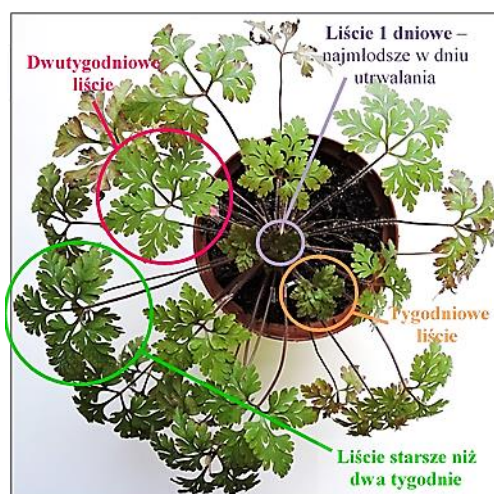


FIGURA 19. Schemat przedstawiający wiek liści pobieranych do obserwacji w TEM. Na schemacie przedstawiono liście jednodniowe, tygodniowe, dwutygodniowe oraz liście starsze niż dwa tygodnie.

III.3.7.5. REAKCJA ROŚLIN Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH NA HERBICYD ROUNDUP

Sprawdzono, czy pomiędzy populacjami torowymi a leśnymi występują różnice w tolerancji na herbicyd Roundup. Przeprowadzono obserwacje makroskopowe roślin oraz obserwacje w TEM ultrastruktury komórek liści roślin z tych dwóch typów populacji. Do oprysku roślin zastosowano jednorazową dawkę herbicydu zalecaną do stosowania na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę (18 000 µg glifosatu).

Rośliny wykorzystane do obserwacji makroskopowych miały około 6 miesięcy. Obserwacje prowadzono przez 35 dni – zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszych rozdziałach. Obserwacje makroskopowe wykonano dla następujących wariantów:

- Zaj-Las (2014) – kontrola (30 roślin), herbicyd (27 roślin) – populacja leśna z Zajezierec;
- Gr-Las1 (2015) – kontrola (5 roślin), herbicyd (5 roślin) – populacja leśna z Gródka;
- BF (2013) – kontrola (17 roślin), herbicyd (15 roślin) – populacja torowa z Białegostoku Fabrycznego;
- Wal-St (2008) – kontrola (22 rośliny), herbicyd (24 rośliny) – populacja torowa z Walił-Stacji, którą wyhodowano z nasion zebranych w 2008 r.;
- Wal-St-rampa (2015/16) – kontrola (9 roślin), herbicyd (8 roślin) – populacja torowa z Walił-Stacji, którą wyhodowano z nasion zebranych w 2015 i 2016 r.;
- ZB (2013) – kontrola (8 roślin), herbicyd (5 roślin), populacja torowa z Zubek Białostockich.

Do badań w TEM wykorzystano rośliny kontrolne i po oprysku herbicydem Roundup, na których po około miesiącu od oprysku herbicydem na najmłodszych liściach były najlepiej widoczne chlorozy. Na każdy wariant wzięto do badań w TEM po dwie rośliny *G. robertianum* z odpowiedniej populacji. Wykonano obserwacje pod binokulem, w mikroskopie świetlnym i TEM – zgodnie z procedurą opisaną we wcześniejszych rozdziałach. Obserwowano następujące warianty:

- Zaj-Las (2014) – kontrola, populacja leśna z Zajezierec;
- Zaj-Las (2014) – po oprysku herbicydem, populacja leśna z Zajezierec;
- Wal-St-rampa (2015/16) – po oprysku herbicydem, populacja torowa z Walił-Stacji;
- BF (2013) – po oprysku herbicydem, populacja torowa z Białegostoku Fabrycznego.

III.3.7.6. CHLOROZ NA LIŚCIACH ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Wykonano doświadczenie, które miało na celu zbadanie natury chloroz pojawiających się u najmłodszych liści po oprysku herbicydem Roundup. Do badań wykorzystano dawkę herbicydu stosowaną na torach kolejowych w ciągu 5 lat (wyliczoną w oparciu o dawkę zalecaną przez producenta, przy założeniu dwukrotnego oprysku w ciągu roku) – 7200 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę (180 000 µg glifosatu). Badane rośliny miały około 11 miesięcy. Obserwacje wykonano po około 1-1,5 miesiąca od oprysku herbicydem, kiedy na najmłodszych liściach pojawiły się chlorozy.

Obserwowano pod binokulem, mikroskopem świetlnym i fluorescencyjnym od jednej do trzech roślin *G. robertianum* z torowych populacji z: Walił-Stacji (Wal-St (2008))

i Białegostoku Fabrycznego (BF (2013)), oraz leśnej populacji z Zajezierec (Zaj-Las (2014)) dla wariantów kontrolnych oraz w próbach po oprysku herbicydem Roundup. Obserwacje makroskopowe trwały przez dwa miesiące. Do obserwacji w SEM wykorzystano trzy rośliny z populacji torowej BF (2013) tylko po oprysku herbicydem. Do badań użyto stołowego skaningowego mikroskopu elektronowego Phenom ProX ze stolikiem do kontroli temperatury, dzięki któremu można oglądać materiał niepoddany preparatyce. Oglądano całe liście oraz przekroje przez blaszki i ogonki liściowe. Badano zarówno najmłodsze liście z wyraźnie widocznymi chlorozami, jak również liście, gdzie chlorozy zaczęły już zanikać. Jako punkt odniesienia wykorzystano starsze liście, na których nie pojawiły się chlorozy.

III.3.7.7. ZAWARTOŚCI GLIFOSATU I AMPA W ROŚLINACH PO OPRYSKU HERBICYDEM

Sprawdzano jaką dawkę herbicydu Roundup otrzymują rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych, w zależności od wielkości roślin. Do badań wykorzystano rośliny w wieku około 7 miesięcy, z populacji torowych: Wal-St (2008), Wal-St-rampa (2015/16), BF (2013), ZB (2013), oraz populacji leśnych: Zaj-Las (2014), Gr-Las1 (2015).

Do badań wykorzystano jednorazową dawkę herbicydu Roundup stosowaną na torach kolejowych (dawka zalecana przez producenta). Było to 25 ml roztworu Roundup o stężeniu 720 mg/l glifosatu na roślinę (18 000 µg glifosatu). Dzień po oprysku herbicydem zliczano liczbę liści na roślinach *G. robertianum* z poszczególnych populacji. Następnie odcinano części nadziemne roślin i ważono je. Po wykonaniu pomiarów podzielono rośliny *G. robertianum* z poszczególnych populacji na próbki (po 5-6 roślin) przeznaczone do analiz chemicznych i umieszczono pocięte rozety w papierowych kopertach. Tak przygotowane próbki pozostawiono na dwa dni w temperaturze pokojowej, w celu wstępnego podsuszenia.

Próbki roślin *G. robertianum* po oprysku herbicydem Roundup oddano do analiz chemicznych na zawartość glifosatu i jego głównego produktu rozpadu AMPA. Analizy zostały wykonane po 5 dniach od oprysku herbicydem. Badania zawartości glifosatu i AMPA wykonano w akredytowanym laboratorium firmy UO-Technologia Sp. z o.o. Dostarczone próbki były brane bezpośrednio do analizy. Po homogenizacji w młynku z każdej próbki odważono po 4 g danej próbki i dodano 10 ml H₂O oraz 10 ml MeOH otrzymując ekstrakt 0,2 g w 1 ml. Glifosat i AMPA oznaczano techniką LC/MS/MS.

III.3.7.8. KWITNIENIE ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* PO OPRYSKU HERBICYDEM ROUNDUP

Sprawdzono wpływ herbicydu Roundup na kwitnące rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W badaniach wykorzystano rośliny w najlepszej kondycji, w wieku około dwóch lat. Badano rośliny z trzech populacji: torowych Wal-St (2008) i Wal3 (2014) oraz leśnej Zaj-Las (2014). Każdą z populacji podzielono na rośliny kontrolne i rośliny poddane opryskom herbicydem Roundup. W badaniach wykorzystano od trzech do sześciu roślin dla każdego wariantu (w zależności od liczby kwitnących roślin w danej populacji). Oprysku herbicydem dokonano dwukrotnie: w dniu startu doświadczenia dawką 60 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę (1200 µg glifosatu), oraz po 21 dniach od pierwszego oprysku – dawką 120 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu (2400 µg glifosatu). Doświadczenie

trwało przez 91 dni (maj-sierpień). Przez pierwszą połowę doświadczenia obserwacje wykonywano raz w tygodniu, później raz na dwa tygodnie. Zliczano na roślinach liczbę: pąków, kwiatów i owoców, oraz wykonywano opis stanu roślin.

III.4. BIOLOGIA REPRODUKCJI ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Celem badań było poznanie biologii reprodukcji roślin *G. robertianum* oraz wykazanie ewentualnych różnic w biologii reprodukcji pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi. Wykonano serię doświadczeń w trakcie dwóch kolejnych sezonów wegetacyjnych. Wszystkie doświadczenia prowadzono w oparciu o metodykę przedstawioną w pracy ZYCH I IN. (2013). W każdej z badanych populacji obserwacjom poddano kilkanaście roślin.

Na początku do badań wykorzystano kwitnące rośliny *G. robertianum* z populacji: torowych z Walił-Stacji – Wal-St-rampa (2015) i Wal-St-napis (2015), oraz leśnej z Zajezierec – Zaj-Las (2015), przywiezione z terenu i trzymane w doniczkach, w jednakowych warunkach. Czas aklimatyzacji roślin przed rozpoczęciem obserwacji wynosił tydzień. Doświadczenie trwało miesiąc i przeprowadzono je w okresie lipiec-sierpień. Po zakończeniu badań pod binokulem i mikroskopem sfotografowano pąki i kwiaty roślin kontrolnych, z każdej populacji. Badano następujące warianty:

- A. Wariant kontrolny (ang. *open-pollination*):** kwiaty w stadium pąka w niezmienionych warunkach (bez izolacji), swobodny dostęp owadów przez cały okres kwitnienia rośliny;
- B. Kwiaty pozbawione fazy żeńskiej (znamion) na samym początku fazy męskiej (ang. *asexual seed formation*):** kwiaty w stadium pąka z usuniętym znamionem słupka, zaizolowane woreczkiem z organzy (dodatkowe zabezpieczenie przed owadami); sprawdzano wystąpienie apomiksji – rozmnażanie przez nasiona, kiedy zarodek powstaje bez procesu zapłodnienia (agamospermia);
- C. Samozapylenie (ang. *self pollination*):** kwiaty w stadium pąka zaizolowane woreczkiem z organzy, uniemożliwiającym dostęp owadów przez cały okres kwitnienia rośliny, ale nie usuwano znamienia słupka; sprawdzano możliwość wystąpienia samozapylenia u roślin, oraz czy założenie izolatora na rośliny wpływa na rozwój pąków;
- D. Kwiaty w stadium pąka z usuniętym znamionem słupka (ang. *asexual seed formation*), bez izolatora:** sprawdzano, czy po usunięciu znamiona słupka w fazie pąka przed zapyleniem, ale bez innej ingerencji, pąki będą dalej się rozwijać, a rośliny kwitnąć i owocować (sprawdzano wystąpienie agamospermii);
- E. Kwiaty po zapyleniu, z usuniętym znamionem słupka po zapyleniu, bez izolacji:** sprawdzano, czy po usunięciu znamiona słupka już po zapyleniu nastąpi owocowanie.

Aby, potwierdzić uzyskane wyniki rośliny *G. robertianum* przesadzono do gruntu i ponownie zbadano. Czas aklimatyzacji roślin przed rozpoczęciem badań, po przesadzeniu do gruntu, wynosił jeden miesiąc. Obserwacje trwały 19 dni w okresie wrzesień-październik.

Zbadano także rośliny pochodzące ze szklarni w wieku około 1-1,5 roku, które przesadzono do gruntu. Wykorzystano rośliny z populacji torowych z Walił-Stacji – Wal-St (2008) i Wal3 (2014), oraz rośliny z populacji leśnej Zaj-Las (2014). Czas

aklimatyzacji roślin przed rozpoczęciem badań wynosił trzy miesiące. Doświadczenie trwało 11 dni i przeprowadzono je w sierpniu.

III.5. OPRACOWANIE WYNIKÓW, ANALIZY STATYSTYCZNE

Uzyskane wyniki analizowano obliczając średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe w programie Microsoft Excel. Analizy statystyczne wykonano za pomocą programu STATISTICA, wersja 12 i 13.1. (STATSOFT, INC.). Dla porównania roślin w wielu grupach wykorzystano nieparametryczny test Kruskala-Wallisa, dla wielu prób niezależnych (poziom istotności $\alpha = 0,05$), zaś przy porównywaniu dwóch grup stosowano test U Manna-Whitneya, dla dwóch prób niezależnych (poziom istotności $\alpha = 0,05$). W kilku przypadkach, dla dokładniejszej analizy, w badaniach biometrycznych zastosowano poziom istotności $\alpha = 0,01$ dla obu powyższych testów.

W celu sprawdzenia podobieństwa roślin w badanych populacjach *G. robertianum* pod względem zestawu wybranych cech biometrycznych, przeprowadzono analizę składowych głównych (PCA – ang. *Principal Component Analysis*) w przestrzeni dwuwymiarowej. Jest to jedna ze statystycznych metod analizy czynnikowej. Analizy PCA wykonano za pomocą programu STATISTICA, wersja 13.1 (STATSOFT, INC.). Wynikiem PCA jest schemat przedstawiający położenie punktów w przestrzeni dwóch głównych składowych (PC1 i PC2), zaś ich położenie ilustruje udział obserwowanej zmienności morfologicznej poszczególnych osobników *G. robertianum* w badanych populacjach.

Wyniki z poszczególnych doświadczeń przedstawiono w tabelach i na wykresach wykonanych w programach Microsoft Excel, Word oraz STATISTICA. Mapy przedstawiające lokalizację badanych populacji wykonano w programie ArcGIS Desktop 10.5. firmy ESRI (ESRI 2016).

III.6. BADANIA GENETYCZNE

III.6.1. POBÓR MATERIAŁU DO BADAŃ GENETYCZNYCH I POPULACJE *G. ROBERTIANUM* WYKORZYSTANE W BADANIACH

W terenie, z każdej z populacji badawczych *G. robertianum* zebrano próbki (liście) z 10 osobników. Próbkę zbierano w transekcie liniowym, z zachowaniem metrowego odstępu pomiędzy poszczególnymi osobnikami. Pobierane z każdej rośliny liście były suszone i przechowywane w żelu krzemionkowym. Również po zakończeniu hodowli szklarniowych pobierano z każdej rośliny w danej populacji próbki (liście) do badań molekularnych i przechowywano je w ten sam sposób, jak próbki pobrane z terenu. Spis wszystkich populacji, które wykorzystano do badań genetycznych przedstawiono w TABELI 1, zaś lokalizację pochodzenia poszczególnych populacji przedstawiono na FIGURZE 20.

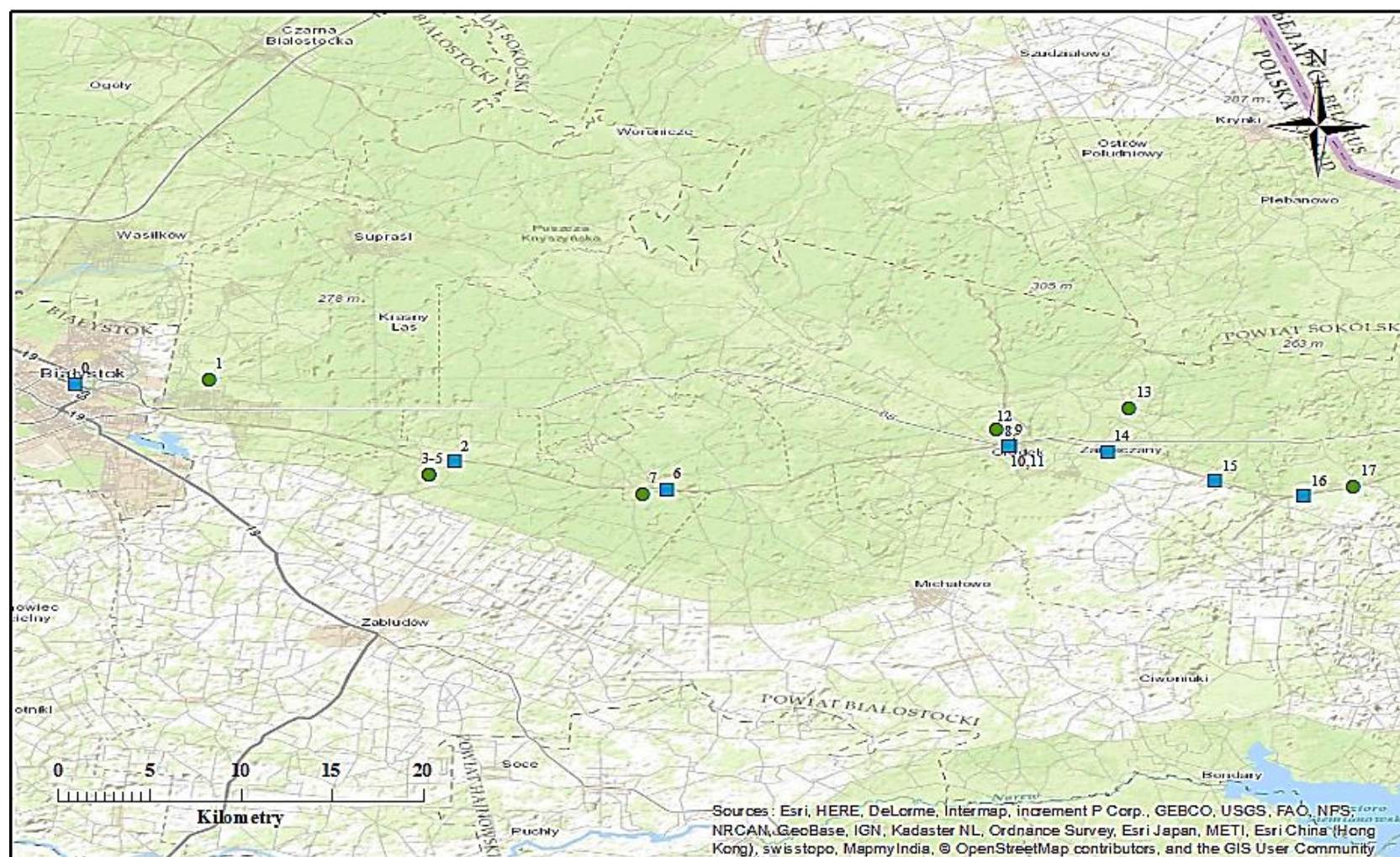


FIGURA 20. Mapa przedstawiająca lokalizację w północno-wschodniej Polsce torowych i leśnych populacji *G. robertianum*, które zostały wykorzystane do badań molekularnych. Symbole populacji: BF (2013) [0], B-Z-Las1 (2014) [1], L-Zaj (2013) [2], Zaj-Las (2008, 2013, 2015) [3-5], Zed (2014) [6], Zed-Las1 (2014) [7], Wal-St (2008) [8], Wal3 (2013) [9], Wal-St-napis (2015) [10], Wal-St-rampa (2015) [11], Wal-Las (2013) [12], Grzyb-Las1 (2014) [13], W-S3C (2013) [14], St-ZB (2014) [15], ZB (2013) [16], ZB-Las1 (2014) [17]. Oznaczenia: ● populacje leśne; ■ populacje torowe. Na mapie nie przedstawiono populacji leśnych: KPN1 (2013) i Francja (2013).

TABELA 1. Populacje wykorzystane w badaniach genetycznych.

Lp.	Symbol	Typ populacji	Pochodzenie próbek	Współrzędne GPS
1.	BF (2013)	torowa	teren	N53°08'18,3"; E023°11'23,0"
2.	B-Z-Las1 (2014)	leśna	teren	N53°08'26,1"; E023°15'20,8"
3.	L-Zaj (2013)	torowa	teren	N53°06'00,7"; E023°22'35,3"
4.	Zaj-Las (2008)	leśna	szklarnia	N53°05'38,9"; E023°21'50,7"
5.	Zaj-Las (2013)	leśna	teren	N53°05'38,9"; E023°21'50,7"
6.	Zaj-Las (2015)	leśna	szklarnia	N53°05'38,9"; E023°21'50,7"
7.	Zed (2014)	torowa	teren	N53°05'11,4"; E023°28'51,4"
8.	Zed-Las1 (2014)	leśna	teren	N53°05'04,2"; E023°28'09,6"
9.	Wal-St (2008)	torowa	szklarnia	N53°06'28,7"; E023°39'00,3"
10.	Wal3 (2013)	torowa	teren	N53°06'28,8"; E023°39'00,1"
11.	Wal-St-napis (2015)	torowa	szklarnia	N53°06'29,2"; E023°39'02,0"
12.	Wal-St-rampa (2015)	torowa	szklarnia	N53°06'28,7"; E023°39'00,3"
13.	Wal-Las (2013)	leśna	teren	N53°06'56,7"; E023°38'39,1"
14.	Grzyb-Las1 (2014)	leśna	teren	N53°07'34,3"; E023°42'33,2"
15.	W-S3C (2013)	torowa	teren	N53°06'18,3"; E023°41'54,4"
16.	St-ZB (2014)	torowa	teren	N53°05'26,1"; E023°45'05,1"
17.	ZB (2013)	torowa	teren	N53°05'00,1"; E023°47'43,8"
18.	ZB-Las1 (2014)	leśna	teren	N53°05'15,1"; E023°49'10,7"
19.	KPN1 (2013)	leśna	teren	N52°19'26,7"; E020°47'00,4"
20.	Francja (2013)	leśna	szklarnia	-

III.6.2. IZOLACJA DNA

Do izolacji genomowego DNA wykorzystano próbki suszonej tkanki liści z badanych populacji *G. robertianum*. Z każdej populacji brano po 10 osobników do badań. Sucha masa próbek wykorzystanych do izolacji wynosiła około 20-25 mg. Izolację DNA przeprowadzono za pomocą zestawu NucleoSpin® Plant II, firmy Machery-Nagel zgodnie z protokołem producenta (MACHERY-NAGEL 2014). Przed izolacją DNA tkanki roślinne homogenizowano z wykorzystaniem ciekłego azotu. Próbkę przechowywano w zamrażalce, w temperaturze – 20°C. Zmierzono stężenie wyizolowanego DNA w próbkach przy $\lambda = 260$ nm (ng/μl), absorbancje (A260) oraz określono współczynnik czystości (A260/A280) przy użyciu NanoDrop Lite (Thermo Scientific), zgodnie z procedurą dostarczoną od producenta. Jakość wyizolowanego DNA sprawdzono także elektroforetycznie za pomocą elektroforezy żelowej w 1% żelu agarozowym.

III.6.3. METODA AFLP

Badanie struktury genetycznej populacji torowych i leśnych *G. robertianum* oraz przestrzennych wzorców różnorodności genetycznej pomiędzy analizowanymi populacjami zostały wykonane przy użyciu techniki AFLP (ang. *Amplified fragment length polymorphism*)². Procedurę AFLP wykonano w oparciu o metodykę przedstawioną w pracach ERNST I IN. (2013), VOS I IN. (1995) oraz HAYASHI I IN. (2005). Startery do przeprowadzenia reakcji AFLP wybrano w oparciu o pracę ERNST I IN. (2013), w której uzyskano zadawalające rezultaty dla spokrewnionego z *G. robertianum* gatunku *Geranium sylvaticum* L. (bodziszek leśny). W badaniach zastosowano kombinację czterech starterów selektywnych:

² Badania genetyczne techniką AFLP wykonano w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego (SGGW), w Katedrze Genetyki i Ogólnej Hodowli Zwierząt, pod opieką dr Łukasza Napory-Rutkowskiego oraz dr Zuzanny Nowak.

EcoRI-AAC/*MseI*-CAG, *EcoRI*-AAG/*MseI*-CTA, *EcoRI*-ATC/*MseI*-CTC oraz *EcoRI*-ATG/*MseI*-CGG. Sekwencje wszystkich adaptorów i starterów zastosowanych w badaniach molekularnych techniką AFLP przedstawiono w TABELI 2. Przed wykonaniem właściwej procedury AFLP wykonano kilka próbnych procedur na niewielkiej liczbie próbek, w celu optymalizacji protokołu.

TABELA 2. Sekwencje starterów i adaptorów zastosowanych w badaniach molekularnych techniką AFLP.

Lp.	Adaptor/starter	Sekwencja 5'→3'
1.	<i>EcoRI</i> Top	CTCGTAGACTGCGTACC
2.	<i>EcoRI</i> Bottom	AATTGGTACGCAGTCTAC
3.	<i>MseI</i> Top	GACGATGAGTCCTGAG
4.	<i>MseI</i> Bottom	CTACTCAGGACTCAT
5.	<i>EcoRI</i> -A	GACTGCGTACCAATTCA
6.	<i>MseI</i> -C	GATGAGTCCTGAGTAAC
7.	<i>EcoRI</i> -AAC	[FAM]GACTGCGTACCAATTCAAAC
8.	<i>EcoRI</i> -AAG	[FAM]GACTGCGTACCAATTCAAAG
9.	<i>EcoRI</i> -ATG	[HEX]GACTGCGTACCAATTCAATG
10.	<i>EcoRI</i> -ATC	[HEX]GACTGCGTACCAATTCAATC
11.	<i>MseI</i> -CAG	GATGAGTCCTGAGTAACCAAG
12.	<i>MseI</i> -CTA	GATGAGTCCTGAGTAACCTA
13.	<i>MseI</i> -CTC	GATGAGTCCTGAGTAACCTC
14.	<i>MseI</i> -CGG	GATGAGTCCTGAGTAACCGG

III.6.3.1. TRAWIENIE DNA

Do badań brano po 10 µl danej próbki, w której znajdowało się około 200 ng DNA. Próbkę trawiono stosując mieszaninę reakcyjną o składzie (objętość na 1 próbkę): 4 µl buforu 10x TANGO, 0,5 µl enzymu restrykcyjnego *MseI* (10 U/µl) (Thermo Scientific), 0,5 µl enzymu restrykcyjnego *EcoRI* (10 U/µl) (Thermo Scientific) i uzupełniano H₂O, aby otrzymać 20 µl mieszaniny na próbkę. Enzymy restrykcyjne wybrano na podstawie publikacji ERNST I IN. (2013). Reakcję trawienia prowadzono w termocyklerze, w temperaturze 37°C przez 120 minut, po czym enzym dezaktywowano w temperaturze 65°C przez 120 minut.

III.6.3.2. LIGACJA ADAPTORÓW

W wyniku reakcji trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi *EcoRI* i *MseI* otrzymano różnej długości fragmenty DNA o tzw. „lepkich końcach”. W reakcji ligacji do uzyskanych fragmentów przyłączano adaptory (syntetyczne oligonukleotydy komplementarne do miejsca restrykcji, czyli specyficznej sekwencji DNA dla enzymu restrykcyjnego), wybrane na podstawie publikacji ERNST I IN. (2013). W ten sposób powstała grupa fragmentów DNA zakończonych identycznymi sekwencjami. Do ligacji zastosowano mieszaninę reakcyjną o składzie (objętość na 1 próbkę): 3 µl 10x bufor, 3 µl 50% PEG, 0,4 µl (2 U) ligazy (5 U/µl) (Thermo Scientific), 1,5 µl adaptoru *EcoRI* (50 µg/µl) i 1,5 µl adaptoru *MseI* (50 µg/µl) [Adaptory: 25 µl Top + 25 µl Bottom (100 µg/µl) = 50 µl (50 µg/µl), 95°C – 5 minut], 0,6 µl H₂O. W sumie otrzymywano 10 µl mieszaniny którą dodawano do całości reakcji trawienia DNA enzymami restrykcyjnym. W sumie otrzymywano po 30 µl mieszaniny na próbkę. Ligację prowadzono bezpośrednio po trawieniu, w temperaturze 4°C przez około 15h. Po ligacji próbki rozcieńczono pięciokrotnie wodą dejonizowaną. Próbkę przechowywano w temperaturze 4°C do czasu przeprowadzenia preamplifikacji.

III.6.3.3. PREAMPLIFIKACJA

Po ligacji adaptorów prowadzono reakcję preamplifikacji (wstępna reakcja PCR) przy użyciu starterów komplementarnych do adaptoru i miejsca restrykcyjnego, posiadających na końcu 3' selektywny nukleotyd (TAB. 2). Startery wybrano na podstawie publikacji ERNST I IN. (2013). Do przeprowadzenia reakcji preamplifikacji zastosowano mieszaninę o składzie (objętość na 1 próbkę): 12,5 μ l OptiTaQ PCR Master Mix (2x) (EURX), 0,5 μ l (10 μ g/ μ l) startera preselektywnego *EcoRI*-A, 0,5 μ l (10 μ g/ μ l) startera preselektywnego *MseI*-C, 8,5 μ l H₂O oraz 3 μ l (wcześniej pięciokrotnie rozcieńczonej) mieszaniny z fragmentami DNA po trawieniu i ligacji. W sumie otrzymywano po 25 μ l mieszaniny na próbkę. Reakcję prowadzono w termocyklerze, w oparciu o schemat opisany w pracy HAYASHI I IN. (2005):

- wstępna denaturacja DNA w temperaturze 72°C przez 5 minut – 1 cykl;
- denaturacja DNA w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 56°C przez 1 minutę, elongacja w 72°C przez 1 minutę – 30 cykli;
- zakończenie reakcji preamplifikacji w 72°C przez 10 minut – 1 cykl;
- stopniowe obniżenie temperatury w termocyklerze do 10°C i ustawienie jej w programie na ∞ .

Po zakończeniu reakcji preamplifikacji wykonano kontrolę jej przebiegu wykorzystując losowo wybrane próbki. Próbki po zakończeniu preamplifikacji rozcieńczono pięćdziesięciokrotnie wodą dejonizowaną. Po przeprowadzeniu preamplifikacji próbki przechowywano w temperaturze 4°C.

III.6.3.4. SELEKTYWNA AMPLIFIKACJA

Przeprowadzono selektywną amplifikację (właściwa reakcja PCR) z użyciem starterów, które na końcu 3' posiadały trzy selekcyjne nukleotydy. Selektywną amplifikację prowadzono z użyciem jednego z czterech układów starterów: *EcoRI*-AAC/*MseI*-CAG, *EcoRI*-AAG/*MseI*-CTA, *EcoRI*-ATC/*MseI*-CTC oraz *EcoRI*-ATG/*MseI*-CGG. Startery wybrano na podstawie pracy ERNST I IN. (2013). Selektywne startery *EcoRI* były znakowane znacznikami fluorescencyjnymi WellRED (FAM lub HEX) (TAB. 2).

Do selektywnej reakcji PCR zastosowano mieszaninę o składzie (objętość na 1 próbkę): 6,25 μ l OptiTaQ PCR Master Mix (2x), 0,5 μ l (10 μ g/ μ l) startera *MseI*, 0,5 μ l (10 μ g/ μ l) znakowanego fluorescencyjnie startera *EcoRI*, 2,25 μ l H₂O oraz 3 μ l (wcześniej pięćdziesięciokrotnie rozcieńczonej) próbki DNA po preamplifikacji. W sumie otrzymywano po 12,5 μ l mieszaniny na próbkę. Reakcję prowadzono w termocyklerze, w oparciu o schemat opisany w pracy HAYASHI I IN. (2005):

- wstępna denaturacja DNA w temperaturze 95°C przez 15 minut – 1 cykl;
- denaturacja DNA w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 66°C przez 1 minutę (z każdym cyklem temperatura przyłączania starterów była niższa o 1°C), elongacja w 72°C przez 2 minuty – 10 cykli;
- denaturacja DNA w 94°C przez 30 sekund, przyłączanie starterów w 56°C przez 1 minutę, elongacja w 72°C przez 2 minuty – 25 cykli;
- zakończenie reakcji preamplifikacji w temperaturze 72°C przez 20 minut – 1 cykl;

- stopniowe obniżenie temperatury w termocyklerze do 10°C i ustawienie jej w programie na ∞ .

Po zakończeniu selektywnej amplifikacji wykonano kontrolę jej przebiegu wykorzystując losowo wybrane próbki. Próbkę po zakończeniu selektywnej amplifikacji rozcieńczono dwudziestokrotnie wodą dejonizowaną. Po przeprowadzeniu selektywnej amplifikacji próbki przechowywano w temperaturze 4°C.

III.6.3.5. ELEKTROFOREZA KAPILARNA

Produkty selektywnej amplifikacji wygenerowane dla każdej z czterech par starterów rozdzielono za pomocą elektroforezy kapilarnej (Applied Biosystems, HITACHI 3500 Genetic Analyzer) – detekcja z zastosowaniem znaczników fluorescencyjnych. Porównywano je względem wewnętrznego markera wielkości GeneScan-500 ROX (Thermo Scientific). Dane o ilości rozdzielonych produktów, ich położeniu względem wzorca oraz wielkości poszczególnych produktów PCR/pików na elektroforegramie uzyskano za pomocą programu GeneMapper.

Do przeprowadzenia elektroforezy kapilarnej zastosowano mieszaninę o składzie (objętość na 1 próbkę): 8,85 μ l HiDi (formamid) (Thermo Scientific), 0,15 μ l standardu wielkości GeneScan-500 ROX (Thermo Scientific) oraz 1 μ l rozcieńzonego wcześniej (dwudziestokrotnie) produktu selektywnej amplifikacji. Otrzymane i elektroforetycznie rozdzielone fragmenty DNA ze wszystkich próbek przedstawiono za pomocą macierzy binarnych zestawionych w tabelach, w programie GeneMapper, w których cyfrą „1” oznaczono obecność danego allelu (produktu PCR/piku) w konkretnym położeniu (*locus*) na elektroforegramie, zaś cyfrą „0” brak danego allelu w danym *locus*. Ostatecznie do analizy przygotowano macierz zawierającą 265 *loci*.

III.6.3.6. ZASTOSOWANE PUNKTY KONTROLNE PRZY PROCEDURZE AFLP

Równolegle do analizy próbek techniką AFLP wykonywano zawsze kontrolę negatywną bez DNA, tzw. NTC (ang. *no template controle*), która była kontrolą czystości odczynników. Jakość namnożonych fragmentów DNA po reakcjach PCR, dla losowo wybranych próbek sprawdzano elektroforetycznie za pomocą elektroforezy poziomej w 1% żelu agarozowym (NOWAK, GRUSZCZYŃSKA 2007). Aby sprawdzić, czy wyniki uzyskane techniką AFLP są wiarygodne, powtórzono całą procedurę AFLP dla losowo wybranych 10% próbek (wraz z powtórzeniem izolacji DNA, zgodnie z wcześniej opisaną metodyką). Uzyskane wyniki były powtarzalne.

III.6.4. METODY ANALIZY DANYCH GENETYCZNYCH

Przed rozpoczęciem analiz statystycznych macierz uzyskana z programu GeneMapper została w programie Excel dodatkowo podzielona według schematu przedstawionego w TABELI 3. Macierz podzielono tak, aby powstały dwie matryce (zgodne z podziałem badanych populacji stosowanym wcześniej w badaniach morfologicznych), zawierające:

- torowe i leśne populacje z badanego obszaru (linia kolejowa nr 37) oraz leśne populacje porównawcze (KPN i Francja);
- populacje torowe z Walił i leśne z Zajezierec, dla których osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion z 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.

Utworzone matryce posłużyły do konstrukcji drzew filogenetycznych i do analizy zróżnicowania genetycznego populacji torowych i leśnych roślin *G. robertianum*. W obu matrycach znalazła się populacja torowa z Walił Wal-St (2008) i leśna z Zajezierec Zaj-Las (2008) opisywane przez WIERZBICKĄ I IN. (2014).

TABELA 3. Podział macierzy z danymi molekularnymi, wykorzystywanymi do analiz statystycznych.

Populacje	Matryca	Liczba populacji	Liczba loci
Torowe: BF (2013), L-Zaj (2013), Zed (2014), Wal-St (2008), W-S3C (2013), St-ZB (2014), ZB (2013)	1	15	265
Leśne: B-Z-Las (2014), Zaj-Las (2008), Zed-Las (2014), Wal-Las (2013), Grzyb-Las (2014), ZB-Las (2014), KPN (2013), Francja (2013)			
Torowe: Wal-St (2008), Wal3 (2013), Wal-St-napis (2015), Wal-St-rampa (2015)	2	7	265
Leśne: Zaj-Las (2008), Zaj-Las (2013), Zaj-Las (2015)			

Szczegółowy opis przeprowadzonych analiz statystycznych, wykonanych oddzielnie dla każdej z opisanych matryc, znajduje się poniżej.

III.6.4.1. PODSTAWOWE PARAMETRY RÓŻNORODNOŚCI GENETYCZNEJ

Do oszacowania poziomu zmienności genetycznej w badanych populacjach *G. robertianum* wykorzystano program AFLP-SURV 1.0 (VEKEMANS 2002; VEKEMANS I IN. 2002). Obliczono podstawowe parametry różnorodności genetycznej wszystkich badanych populacji *G. robertianum*, takie jak: liczba i udział polimorficznych *loci*, współczynnik różnorodności genetycznej (NEI, LI 1979).

W programie Excel została obliczona dodatkowa miara dywergencji, tzw. parametr DW (*frequency-down-weighted marker values*). Dla każdej populacji, liczba powtórzeń każdego markera AFLP w tej populacji została podzielona przez liczbę przypadków występowania danego markera w całym zestawie danych. Na koniec wartości te zostały zsumowane (SCHÖNSWETTER, TRIBSCH 2005). Obliczeń dokonano dla każdej z przygotowanych matryc indywidualnie.

III.6.4.2. STRUKTURA GENETYCZNA POPULACJI

Do obliczenia parametrów takich, jak: dystans genetyczny Nei, dystans genetyczny Reynolds'a oraz *Fst* pomiędzy parami populacji (FELSENSTEIN 1993; LYNCH, MILLIGAN 1994; REYNOLDS I IN. 1983) posłużył program AFLP-SURV 1.0.

Do ustalenia wzorów struktury genetycznej w populacjach *G. robertianum* zastosowano metody grupowania Bayesowskiego. Założono, że w danym zestawie danych (macierzy) istnieje K subpopulacji (K może być nieznane), zaś każda z K subpopulacji charakteryzuje się odrębnym wzorcem frekwencji alleli w każdym z badanych *locus*. Każdy

z osobników został probabilistycznie zaklasyfikowany do jednej z K subpopulacji (FALUSH I IN. 2003, 2007; PRITCHARD I IN. 2000). Analiza danych została wykonana w programie STRUCTURE 2.3. (HUBISZ I IN. 2009; PRITCHARD I IN. 2000). Pliki wyjściowe dla poszczególnych matryc przygotowano w programie AFLP-SURV 1.0. Do analiz w programie STRUCTURE zastosowano model bez admiksji, o nieskorelowanej frekwencji alleli (KUTA I IN. 2014; WĄSOWICZ I IN. 2014).

Najbardziej prawdopodobny model struktury genetycznej dla badanych populacji oszacowano *ad hoc* zgodnie z metodyką opisaną w pracy EVANNO I IN. (2005). Obliczono maksymalną wartość funkcji $\Delta K/K$ na podstawie funkcji $\text{LnP}(D)$, którą wykreślono w oparciu o wyniki otrzymane po wykonaniu symulacji w programie STRUCTURE. Za istotne uznano takie poziomy K, dla których funkcja $\Delta K/K$ przyjmowała wartości istotnie różne od zera. Symulacje przeprowadzono dla badanych matryc indywidualnie. W każdej z symulacji testowano prawdopodobieństwo występowania odpowiednio od 1 do 7 lub od 1 do 15 możliwych wartości funkcji K (w zależności od ilości badanych populacji w danej matrycy – patrz: TABELA 3), dokonując 10 iteracji dla każdego K. Zastosowano metodę Monte Carlo w oparciu o łańcuchy Markova – MCMC (ang. *Monte Carlo Markov Chain*), stosując następujące parametry: długości okresu *burn-in* łańcucha Markova 50 000 oraz liczba pokoleń MCMC 500 000 (EVANNO I IN. 2005; WĄSOWICZ I IN. 2014).

Do zbadania ogólnych relacji genetycznych pomiędzy populacjami *G. robertianum* wykorzystano program SplitsTree4, wersję 4.14.4 (HUSON, BRYANT 2006). Skonstruowano nieukorzenione drzewa (dendrogramy) z zastosowaniem algorytmu *Neighbor-Joining*, tzw. NJ (łączenie najbliższych sąsiadów) (SAITOU, NEI 1987) w oparciu o badane matryce. Pliki wyjściowe do analizy w programie SplitsTree otrzymano wykorzystując program FAMD, wersja 1.31. (SCHLÜTER, HARRIS 2006). Utworzono konsensusowe drzewo NJ, gdzie uwzględniono kłady występujące w więcej niż 50% wygenerowanych dendrogramach. Rzetelność kładów otrzymanych dendrogramów szacowano metodą *bootstrap* (samopróbkowania) stosując 1000 powtórzeń (FELSENSTEIN 1993). Metoda *Neighbor-Joining* polega na łączeniu osobników podobnych pod względem genetycznym na tych samych gałęziach dendrogramu. Długość gałęzi głównych powstałego drzewa ilustruje podobieństwo pomiędzy wyodrębnionymi grupami osobników. Im mniejsza długość gałęzi głównych drzewa, tym badane populacje są do siebie bardziej podobne (SAITOU, NEI 1987).

III.6.4.3. ANALIZA WARIANCJI MOLEKULARNEJ (AMOVA)

Rozkład zmienności genetycznej wewnątrz populacji i pomiędzy grupami populacji leśnych i torowych *G. robertianum* sprawdzono wykorzystując molekularną analizę wariancji (tzw. AMOVA). Analizę AMOVA wykonano w programie Arlequin 3.5. (EXCOFFIER, LISCHER 2010). Istotność statystyczną indeksów zróżnicowania testowano w 10000 powtórzeniach (EXCOFFIER I IN. 1992). Do przygotowania plików wyjściowych do programu Arlequin posłużył program FAMD.

IV. WYNIKI

IV.1. WARUNKI SIEDLISKOWE PANUJĄCE NA TORACH KOLEJOWYCH I W LASACH

Celem przeprowadzonych obserwacji było porównanie warunków siedliskowych panujących na torach kolejowych i w lasach, gdzie obserwowano występowanie badanych populacji roślin *G. robertianum* (FIG. 21). W ramach tego rozdziału przedstawiono wyniki dotyczące wyglądu liści roślin z populacji torowych i leśnych w zależności od stopnia nasłonecznienia / zacienienia danego siedliska. Przedstawiono opisy obszarów, gdzie występowały rośliny *G. robertianum* oraz oceniono wielkość występujących na poszczególnych stanowiskach populacji tych roślin. Przedstawiono także wyniki natężenia światła dla wybranych stanowisk terenowych. Na TABLICACH I-V znajdują się zdjęcia z wybranych stanowisk torowych i leśnych na badanym obszarze. Na FIGURZE 21 przedstawiono mapę, gdzie pokazano wielkości poszczególnych populacji *G. robertianum* na badanym obszarze. Opis warunków siedliskowych i wielkości wszystkich populacji wykorzystanych do badań przedstawiono w TABELI 4.

STANOWISKA NA TORACH KOLEJOWYCH

Na badanym obszarze populacje *G. robertianum* często pojawiały się na torach kolejowych. Na mapie (FIG. 21) pokazano, iż na torach kolejowych w okolicach Białegostoku (początek linii kolejowej nr 37) oraz w okolicach miejscowości Waliły-Stacja (środek linii nr 37) znajdowały się liczne skupienia dużych populacji roślin *G. robertianum*. Natomiast na pozostałych odcinkach linii nr 37, w rejonach, gdzie nie ma większych miejscowości występowanie roślin *G. robertianum* było ograniczone do pojedynczych populacji – w większości przypadków były to populacje duże lub średniej wielkości (FIG. 21; TAB. 4).

Zaobserwowano, że na torach kolejowych większe populacje *G. robertianum* występowały zarówno na stanowiskach dobrze nasłonecznionych – takich jak Białystok Fabryczny (punkt BF) i Waliły-Stacja (punkt Wal3) (TAB. 4; TABLICA I), jak również na stanowiskach, które były częściowo zacienione przez bezpośrednie sąsiedztwo lasu liściastego (TAB. 4; TABLICA II).

Rośliny *G. robertianum* występujące na słonecznych stanowiskach torowych miały intensywnie czerwone liście i były niewielkich rozmiarów. Rośliny *G. robertianum* w zacienionych miejscach były większe i miały mniej zaczerwienione liście niż rośliny, które występowały na stanowiskach całkowicie odsłoniętych. W przypadku stacji Waliły-Stacja większość obszaru była dobrze nasłoneczniona, jednak bezpośrednio pod rampą stacji rośliny były częściowo osłonięte przed słońcem (TAB. 4; TABLICA I, II).

Rośliny *G. robertianum* na torach kolejowych nie występowały w miejscach, gdzie dookoła były tylko bory oraz, tam gdzie na torach występowała roślinność trawiasta i wkraczały drzewa (TAB. 4; TABLICA III). Jedynym wyjątkiem był punkt zlokalizowany, na niegdyś dużej stacji Zubki Białostockie, gdzie pomimo zarośnięcia torów roślinnością trawiastą i wkraczania boru stwierdzono występowanie roślin *G. robertianum* (TAB. 4; TABLICA II).

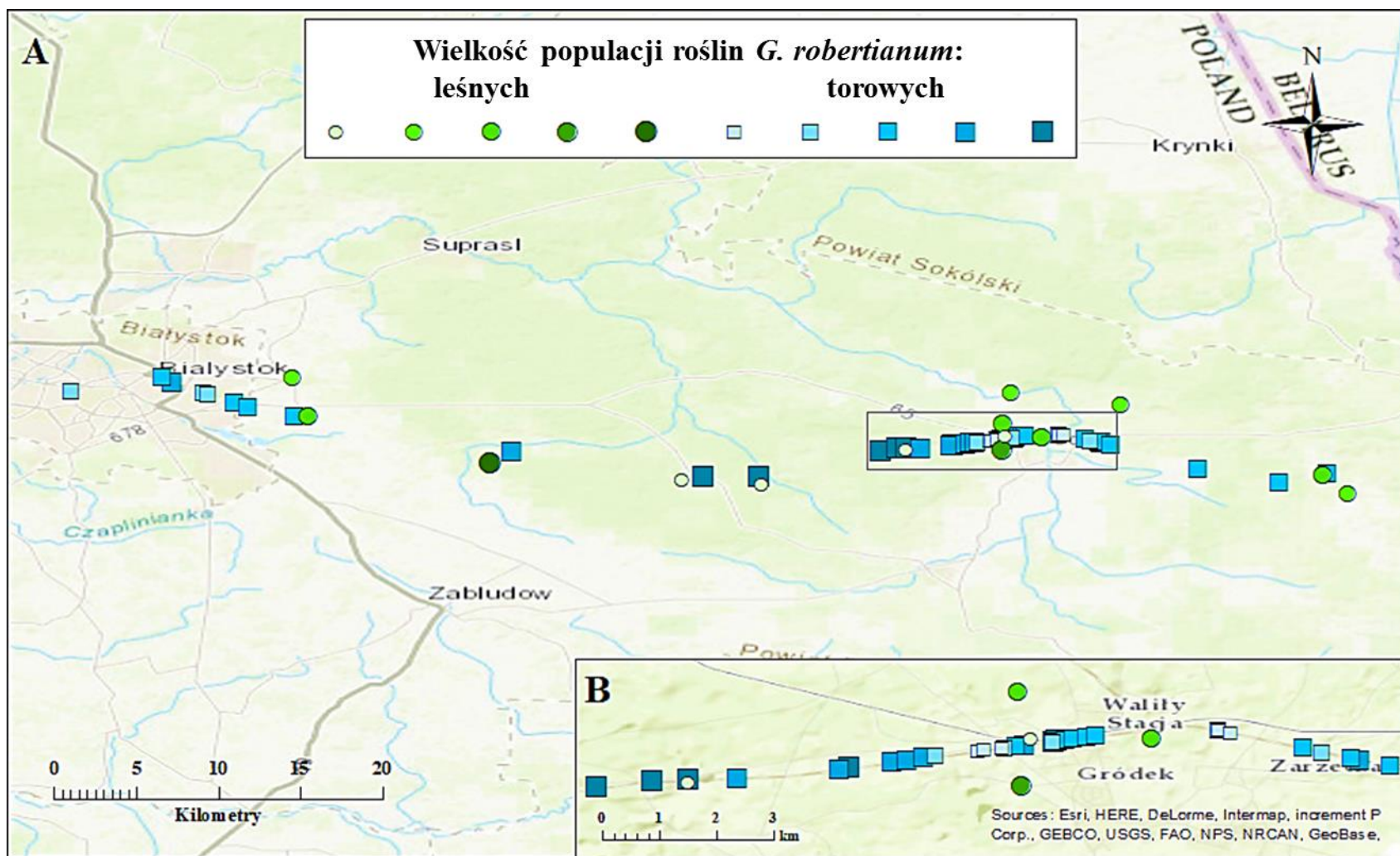


FIGURA 21. Mapa przedstawiająca miejsca występowania na badanym obszarze (północno-wschodnia Polska, okolice linii kolejowej nr 37) torowych i leśnych populacji *G. robertianum*, oraz wielkość poszczególnych populacji: cały badany obszar (A), obszar przy miejscowości Waliby-Stacja (B).

Oznaczenia: ○ ● ● ● ● populacje leśne; □ □ □ □ □ populacje torowe. Wielkość znacznika oraz intensywność jego koloru oznacza wielkość danej populacji *G. robertianum*, odpowiednio od najmniejszego do największego znacznika – im większy znacznik tym ciemniejszy kolor: pojedyncze osobniki (○ □), kilka osobników (● □), mała populacja (● □), średnia populacja (● □), duża populacja (● □) *G. robertianum*.

TABELA 4. Opis warunków siedliskowych panujących na torach kolejowych i w lasach, gdzie występowały badane populacje roślin *G. robertianum*. W tabeli przedstawiono informacje na temat wielkości populacji w danym punkcie: kilka osobników (najmniejsze populacje), mała populacja (do ~50 osobników), średnia populacja (do ~100 osobników), duża populacja (kilkaset osobników). W tabeli opisano punkty w kolejności występowania w kierunku z zachodu na wschód, począwszy od Białegostoku.

Lp.	Akronim populacji	Współrzędne GPS	Typ populacji	Wielkość populacji	Opis siedliska i miejsca występowania roślin <i>G. robertianum</i>
1.	BF	N53°08'18,3"; E023°11'23,0"	Torowa	Średnia	Duża stacja kolejowa Białystok Fabryczny. Kilka pozarastanych roślinnością torów. <i>G. robertianum</i> występował płatowo na torach i pomiędzy nimi. Dookoła stacji osiedla, zadrzewienia i składowisko złomu.
2.	B1	N53°07'57,1"; E023°12'25,2"	Torowa	Kilka osobników	Stanowisko na torze za stacją Białystok Fabryczny. Dookoła punktu zbioru las liściasty. W punkcie tym więcej osobników <i>G. robertianum</i> występowało na nasypie kolejowym niż na torze, gdzie pomiędzy osobnikami były większe odstępy niż na nasypie; wokół toru występował obszar zarośnięty krzewami i lasem.
3.	B-Z-Las1	N53°08'26,1"; E023°15'20,8"	Leśna	Kilka osobników	Las przy drodze, po bokach drogi zagłębienia z roślinnością grądową. Przy drodze fragment grądu z lipą drobnolistną, klonem zwyczajnym i dębem szypułkowym, dalej bór. Runo siedlisk żyznych, grądowe, bujne. Występowały rośliny przydrożne np. glistnik jaskółcze ziele, jaskier ostry.
4.	B-Z2	N53°07'08,7"; E023°15'25,4"	Torowa	Mała	Drugie stanowisko na torze za stacją Białystok Fabryczny. Rośliny <i>G. robertianum</i> występowały bardziej na nasypie kolejowym niż torze. W okolicy bodziszek pojawiał się punktowo na linii kolejowej. Dookoła zadrzewienie, dalej teren przemysłowy lub teren bardziej otwarty. Punkt niedaleko drogi krzyżującej się z torem. W okolicznym drzewostanie stwierdzono dominację topoli osiki.
5.	Sob-Las1	N53°07'10,3"; E023°15'52,2"	Leśna	Mała	Las w pobliżu miejscowości Sobolewo. Rośliny <i>G. robertianum</i> występowały przy drodze leśnej, częściowo zacienionej, niedaleko przejazdu kolejowego i zabudowań ludzkich. Bór sosnowy z gatunkami liściastymi w podszybie – dąb szypułkowy, bez czarny, jesion wyniosły, klon zwyczajny, czeremcha amerykańska.
6.	L-Zaj	N53°06'00,7"; E023°22'35,3"	Torowa	Średnia	Tor za wsią Łukiany. Punkt oddalony około 2,5 km od wsi Zajezerce i około 0,5 km od punktu Zaj-Las. W pobliżu, po obu stronach toru obecne były zabudowania oraz występował las w pewnym oddaleniu od toru. W bezpośrednim sąsiedztwie nasypu występowała roślinność trawiasta. <i>G. robertianum</i> występował na torze i nasypie.
7.	Zaj-Las	N53°05'38,9"; E023°21'50,7"	Leśna	Duża	Stanowisko leśne zlokalizowane za wsią Zajezerce (około 2 km od wsi). Las mieszany z gatunkami takimi, jak brzoza brodawkowata, sosna zwyczajna, dąb szypułkowy, świerk pospolity, kruszyna pospolita i jarząb pospolity. Punkt zlokalizowany był w bezpośrednim sąsiedztwie drogi leśnej (w głębi lasu także obserwowano występowanie <i>G. robertianum</i> , jednak nie aż tak licznie jak przy drodze). <i>Z tego punktu pochodziły nasiona zebrane w 2008 r. Populacja opisywana przez WIERZBICKĄ I IN. (2014).</i>
8.	Zed	N53°05'11,4"; E023°28'51,4"	Torowa	Duża	Zwarte skupisko roślin <i>G. robertianum</i> , rozciągające się na długości około 30 m. Na zachód od tego punktu znajduje się stacja Żednia a na wschód przecinająca tor droga. Najbliższe otoczenie torów to teren podmokły, nitrofilny, z gatunkami typowymi dla olsu. Dalej występował las mieszany – obserwowano gatunki takie, jak: brzoza brodawkowata, olsza czarna, topola osika, widoczne były także nasadzenia świerka pospolitego.

9.	Zed-Las1	N53°05'04,2"; E023°28'09,6"	Leśna	Kilka osobników	Żyzne, wilgotne stanowisko o znacznym zacieleniu, za miejscowością Żednia, na skraju leśnej drogi. Po jednej stronie występował ols a po drugiej bór świerkowy. <i>G. robertianum</i> obecny tylko w paśmie tuż przy drodze obok pokrzywy zwyczajnej, śledziennicy skrętolistnej, kuklika pospolitego i innych gatunków olsowych oraz siedlisk żyznych i wilgotnych. Drzewa: olsza czarna, czeremcha zwyczajna i świerk pospolity.
10.	Sok	N53°05'10,5"; E023°30'40,9"	Torowa	Duża	Tor na wysokości peronu stacji Sokole Białostockie. Od północy i południa było kilkanaście metrów otwartego terenu a dalej: od południa las mieszany z dominacją sosny zwyczajnej, oraz obecnością świerka pospolitego, topoli osiki, wierzb i brzozy brodawkowatej; od północy droga, a za nią bór iglasty z domieszką brzozy brodawkowatej i innych gatunków liściastych. <i>G. robertianum</i> występował też na częściowo zacienionym peronie wśród roślinności ruderalnej. Osobniki <i>G. robertianum</i> występowały w bezpośrednim sąsiedztwie toru.
11.	Sok-Las1	N53°04'56,4"; E023°30'44,9"	Leśna	Kilka osobników	Skraj lasu, populacja przy drodze leśnej, w pobliżu zabudowań. W miejscu występowania <i>G. robertianum</i> występował znaczny udział drzew liściastych: dąb szypułkowy, jarząb pospolity, lipa drobnolistna, bez czarny, wierzby, kruszyna pospolita, klon zwyczajny, czereśnia. W głębi lasu dominował świerk pospolity i sosna zwyczajna, nie obserwowano tam <i>G. robertianum</i> .
12.	W-SB7A	N53°06'07,1"; E023°35'31,7"	Torowa	Duża	Więcej osobników <i>G. robertianum</i> niż w innych punktach na torze w pobliżu. Dookoła grąd i bór mieszany. Rośliny <i>G. robertianum</i> występowały na torze i schodziły tylko do podstawy nasypu. W bezpośrednim sąsiedztwie nasypu nie było osobników <i>G. robertianum</i> . W pewnej odległości po obu stronach toru był bór.
13.	W-SB6C	N53°06'14,0"; E023°37'03,4"	Torowa	Duża	Kontynuacja pasa roślin <i>G. robertianum</i> na torze, na wschód od punktu W-SB7A. <i>G. robertianum</i> występował pomiędzy innymi roślinami. Miejsce zacienione, po obu stronach toru obecny był las, w którym występowały większe skupiska olszy czarnej.
14.	W-SB6	N53°06'19,7"; E023°37'46,0"	Torowa	Średnia	Punkt na wschód od populacji W-SB6C, zaś skupienie roślin <i>G. robertianum</i> na torze było mniej liczne, niż w poprzedniej populacji. Po obu stronach nasypu występował las mieszany.
15.	Wal1	N53°06'25,6"; E023°38'32,4"	Torowa	Kilka osobników	Poza torem brak w okolicy <i>G. robertianum</i> . Punkt zlokalizowany na początku miejscowości Waliły-Stacja. Wokół toru teren otwarty. Na północy ok. 150 m od toru zagroda, dalej droga ekspresowa. Na południe od toru teren otwarty, dalej zabudowania. Na zachód ok. 300 m do lasu, przed lasem mniejsza droga. Na wschód stacja Waliły-Stacja, dalej od północy i południa toru, w bezpośredniej odległości bór.
16.	Wal2	N53°06'26,8"; E023°38'43,7"	Torowa	Średnia	Punkt na wschód od populacji Wal1. Pojedynczy tor rozdzielał się na 5 torów, biegnących równolegle obok siebie. Dwa zewnętrzne tory były mocno zarośnięte różnymi roślinami ruderalnymi. <i>G. robertianum</i> dominował na środkowych torach i pomiędzy nimi. Poza torami brak <i>G. robertianum</i> w okolicy. Dookoła teren otwarty, od północy droga ekspresowa (za nią główna część miejscowości Waliły-Stacja) a od południa pojedyncze zabudowania.
17.	Wal3	N53°06'28,8"; E023°39'00,1"	Torowa	Duża	Punkt na wschód od populacji Wal2, przy peronie stacji Waliły-Stacja. Pięć torów biegnących równolegle. Boczny tor był całkowicie zarośnięty roślinnością trawiastą. <i>G. robertianum</i> występował masowo na trzech środkowych torach oraz przy rampie, na której położony jest przystanek stacji. Od północy droga ekspresowa (za nią główna część miejscowości Waliły-Stacja) a od południa pojedyncze zabudowania. Większy płat roślin <i>G. robertianum</i> ciągnął się aż do napisu Waliły-Stacja, zaś dalej osobniki występowały bardziej punktowo na jednym torze, który przecina drogę i biegnie dalej na wschód. Za drogą od północy i południa przy nasypie, który stopniowo się podnosił, występował bór.
18.	Wal-St-rampa	N53°06'28,7"; E023°39'00,3"	Torowa	Mała	Populacja zlokalizowana pod peronem (rampą) stacji Waliły-Stacja (patrz opis punktu Wal3). <i>Z tego punktu (spod rampy) pochodziły nasiona zebrane w 2008 r. Populacja opisywana przez WIERZBICKĄ I IN. (2014).</i>

19.	Wal-St-napis	N53°06'29,2"; E023°39'02,0"	Torowa	Duża	Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana na torach i między torami na wysokości napisu Waliły-Stacja (patrz opis punktu Wal3).
20.	Wal-Las	N53°06'56,7"; E023°38'39,1"	Leśna	Mała	Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana w lesie za miejscowością Waliły-Stacja (od północy). Za Waliłami dominował bór mieszany. Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana była na skraju polany. W bezpośrednim sąsiedztwie nie występowały inne populacje <i>G. robertianum</i> . W drzewostanie dominował świerk pospolity i sosna zwyczajna. W warstwie krzewów występowała głównie czeremcha amerykańska.
21.	Gr-Las1	N53°06'04,2"; E023°38'41,5"	Leśna	Średnia	Las liściasty, przechodzący miejscami w bór mieszany, w pobliżu miejscowości Gródek, niedaleko Walił. Duży płat <i>G. robertianum</i> występował pod innymi roślinami w gęstym runie leśnym, typowym dla grądu. Populacja zlokalizowana na skraju lasu przy drodze. Punkt mocno zacieniony. Wśród starszych drzew dominowała sosna zwyczajna, a wśród młodszych drzew i krzewów przeważały leszczyna pospolita, kruszyna pospolita, jesion wyniosły, klon jesionolistny i mirabelka. Siedlisko wilgotne, żyzne.
22.	Gr-Las2	N53°06'30,0"; E023°39'55,6"	Leśna	Mała	Las w pobliżu miejscowości Gródek, niedaleko Walił, ale położony znacznie bardziej na wschód niż punkt Gr-Las1. Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana była na skraju lasu przy zarastającej podmokłej łące. W tym punkcie występował las liściasty z dominacją topoli osiki. Gatunki runa i podszytu o charakterze olsowo-grądowym. Runo dobrze rozwinięte, żyzne, podmokłe siedlisko. W opisywanym punkcie w drzewostanie nie było sosny, natomiast dalej dookoła tego fragmentu był bór. Niedaleko przebiegały tory kolejowe.
23.	Grzyb-Las1	N53°07'34,3"; E023°42'33,2"	Leśna	Kilka osobników	Punkt przy rzece Grzybówce, las o charakterze olsowym, niewielki obszar olsu. Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana była w zagłębieniu przy drodze przecinającej las i rzeczkę. W pobliżu bory i otwarte przestrzenie polne. Wśród drzew dominowała olsza czarna, a w runie występowały gatunki siedlisk żyznych i wilgotnych, np. pokrzywa zwyczajna, kuklik pospolity, jaskier ostry, trzcina pospolita, gatunki łąk wilgotnych i storczyki (<i>Dactylorhiza</i> sp.).
24.	Kro-Las1	N53°07'56,0"; E023°38'58,1"	Leśna	Kilka osobników	Stanowisko w pobliżu punktów Grzyb-Las i Wal-Las. Początek boru, niedaleko rzeki Supraśl. Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana na skraju lasu, gdzie dominowały drzewa liściaste. Skrajny fragment boru mieszanego, w zasięgu oddziaływania doliny rzecznej. Dominacja sosny zwyczajnej, a wśród gatunków liściastych występowały m.in. jarzab pospolity, leszczyna pospolita, kruszyna pospolita i dąb czerwony.
25.	W-S1	N53°06'35,5"; E023°40'34,0"	Torowa	Kilka osobników	Populacja pojawiająca się na torze po dłuższej przerwie, przed kładką nad rzeką Supraśl. Osobniki <i>G. robertianum</i> występowały na torze i na nasypie, między innymi roślinami. Bezpośrednio za kładką brak roślin <i>G. robertianum</i> . Tor biegł w tym miejscu na bardzo wysokim nasypie.
26.	W-S3	N53°06'25,1"; E023°41'22,3"	Torowa	Mała	Osobniki <i>G. robertianum</i> występowały razem z innymi roślinami na torze. Osobniki rozsiane, co kilka metrów. Między Waliłami a tym punktem osobniki <i>G. robertianum</i> występowały na torze sporadycznie – głównie w pobliżu kładki nad rzeką Supraśl, na torze i nasypie. Tor przecina droga na Zarzeczany. Dookoła występował bór, w bezpośrednim sąsiedztwie linii.
27.	W-S3C	N53°06'18,3"; E023°41'54,4"	Torowa	Średnia	Punkt na wschód od W-S3. Dookoła toru od północy i południa bór. Za tym punktem było, coraz mniej osobników <i>G. robertianum</i> aż do zupełnego zaniku na dłuższym odcinku linii kolejowej, która mocno zarosła roślinnością trawiastą i powoli zaczęła zarastać drzewami iglastymi.

28.	St-ZB	N53°05'26,1"; E023°45'05,1"	Torowa	Mała	Punkt zlokalizowany między stacją Staraszewo a Zubki. Jeden tor, na nasypie. Obok bór sosnowy, z udziałem świerku pospolitego i młodych drzew liściastych (głównie brzozy brodawkowatej). Rośliny <i>G. robertianum</i> dominowały tam, gdzie nie było traw a brakowało ich tam, gdzie trawy występowały. Wzdłuż linii kolejowej między Staraszewem a Zubkami występowały głównie bory (nasadzenia sosny) – brak <i>G. robertianum</i> w lesie, w bezpośrednim sąsiedztwie linii kolejowej. Dalej na wschód, na torze między Staraszewem a Zubkami występowały niewielkie populacje <i>G. robertianum</i> .
29.	ZB	N53°05'00,1"; E023°47'43,8"	Torowa	Mała	Końcowa stacja linii kolejowej nr 37 – duża stacja z oświetleniem, kilka torów. Został ślad po wyburzonym budynku stacji. Tory były mocno zarośnięte trawą. Na torach rosło wiele kilku/kilkudziesięcioletnich drzew – głównie sosen. Osobniki <i>G. robertianum</i> zostały znalezione na bocznych torach i nasypie od strony ścieżki, również na ścieżce i na skraju lasu obok ścieżki (wchodził na kilka metrów w las). Na środkowych torach brak <i>G. robertianum</i> . Po obu stronach stacji występował bór.
30.	ZB-Las1	N53°05'15,1"; E023°49'10,7"	Leśna	Mała	Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana niedaleko punktu ZB-P1, w stronę miejscowości Zubki. Punkt przy leśnej drodze. Grąd, przechodzący dalej od drogi w ols. Siedlisko wilgotne. W pobliżu stwierdzono takie gatunki, jak klon zwyczajny, czeremcha zwyczajna, kruszyna pospolita, kuklik zwisły, glistnik jaskółcze ziele. W drzewostanie dominowała olsza czarna. Dalej, w pobliżu miejscowości Zubki występowały głównie bory.
31.	ZB-Las2	N53°04'39,5"; E023°50'01,0"	Leśna	Kilka osobników	Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana za punktem ZB-P1 w kierunku miejscowości Zubry. Las przy drodze – bór (monokultura sosnowa), z kawałkiem brzożowo-klonowym, w którym występowały rośliny <i>G. robertianum</i> (naturalny podrost – pas około 10 m).
32.	ZB-P1	N53°05'16,2"; E023°49'19,2"	Torowa	Mała	Populacja na wschód od punktu ZB, koło miejscowości Zubki. Tor na 2-3 m nasypie. W okolicy głównie bory, odnowienie z gatunków liściastych. Od północy ols a od strony południowej fragment zalanego olsu z martwymi olchami, łozowiskiem i łąką kośną. Na torach przy skrzyżowaniu drogi Zubki – Świsłoszczany brak <i>G. robertianum</i> . Dalej od drogi w kierunku punktu ZB (na zachód) osobniki <i>G. robertianum</i> pojawiały się punktowo na torach.
33.	KPN1	N52°19'26,7"; E020°47'00,4"	Leśna	Kilka osobników	Punkt w Kampinoskim Parku Narodowym, w pobliżu obszaru ochrony ścisłej „Sieraków”. Bór mieszany, idący w kierunku grądu. Dominacja sosny zwyczajnej, udział dębu szypułkowego, pojawiała się także czeremcha zwyczajna, kruszyna pospolita i leszczyna pospolita. Widoczne było zaburzenie w występowaniu sosny (prawdopodobnie po pożarze). W runie występowały gatunki borowe i grądowe.
34.	Francja	-	Leśna	Mała	Zachodnia część miasta Lyon (Francja). Populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana była na terenach zielonych – w grądzie przy Hotelu Valpre.
35.	Słowacja	-	Leśna	Mała	Punkt między miejscowościami Bodružal a Prikra, na Słowacji. Las liściasty, populacja <i>G. robertianum</i> zlokalizowana była tuż przy drodze.

STANOWISKA W LASACH

W przypadku stanowisk znajdujących się w lasach w bezpośrednim sąsiedztwie linii kolejowej nr 37 dominowały bory – głównie nasadzenia sosny zwyczajnej i świerka pospolitego. Były to obszary, gdzie nie stwierdzono występowania roślin *G. robertianum*. W nielicznych przypadkach obserwowano występowanie roślin *G. robertianum* w lasach lub zadrzewieniach w bezpośrednim sąsiedztwie badanej linii kolejowej, jednak tylko w miejscach, gdzie występowały w pobliżu torów drzewa liściaste. Występujące w takich miejscach populacje *G. robertianum* były najczęściej bardzo małe, lub też były to pojedyncze osobniki. Większe populacje *G. robertianum* obserwowano w lasach oddalonych nieco od torów kolejowych. Były to stanowiska, gdzie w drzewostanie dominowały drzewa liściaste – najczęściej gatunki grądowe (takie, jak: dąb szypułkowy, lipa drobnolistna, klon zwyczajny), rzadziej innych siedlisk np. olsów (m.in. olsza czarna, brzoza brodawkowata) (FIG. 21; TAB. 4; TABLICA IV, V).

Zaobserwowano, że w lasach rośliny *G. robertianum* najczęściej pojawiały się przy drogach leśnych i polanach. Natomiast im dalej w głąb lasów liściastych tym populacje *G. robertianum* były coraz mniej liczne i były zastępowane innymi gatunkami. W porównaniu do osobników występujących na torach kolejowych rośliny *G. robertianum* występujące w lasach były większe i miały intensywnie zielone blaszki liściowe (TAB. 4; TABLICA IV, V).

NATĘŻENIE ŚWIATŁA NA TORACH KOLEJOWYCH I W LASACH

Podstawowa różnica siedliskowa pomiędzy stanowiskami *G. robertianum* na torach kolejowych i w lasach to zróżnicowane natężenie światła (FIG. 22). Zdecydowanie wyższe natężenie światła występowało na torach kolejowych niż w lasach. Zależność ta utrzymywała się nawet przy zachmurzeniu, tak jak miało to miejsce w przypadku pomiaru natężenia światła na stanowisku na stacji Sokole Białostockie (oznaczenie populacji: Sok). Na stanowiskach na torach kolejowych w słoneczny dzień natężenie światła wynosiło średnio około 80 000 lx, podczas gdy na stanowiskach w lasach średnie natężenie światła wynosiło wówczas poniżej 10 000 lx.

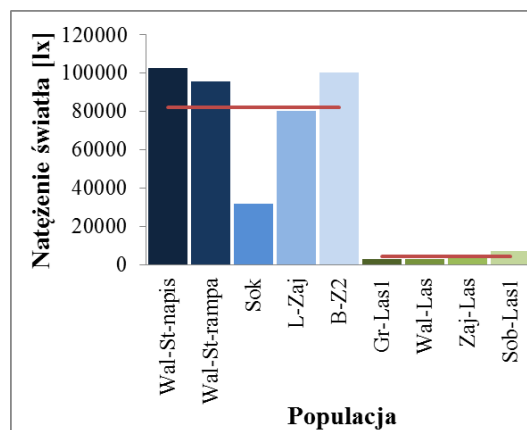


FIGURA 22. Natężenie światła [lx] dla 5 wybranych miejsc występowania populacji torowych *G. robertianum* (Wal-St-napis, Wal-St-rampa, Sok, L-Zaj, BZ-2) oraz 4 miejsc występowania populacji leśnych (Gr-Las1, Wal-Las, Zaj-Las, Sob-Las1), zlokalizowanych w północno-wschodniej Polsce. Czerwonymi liniami oznaczono średnie natężenie światła dla danej grupy stanowisk *G. robertianum* – torowych i leśnych.

IV.2. PORÓWNANIE ROŚLIN WYSTĘPUJĄCYCH NA TORACH KOLEJOWYCH I W LASACH

Celem przeprowadzonych badań biometrycznych była ocena zróżnicowania fenotypowego roślin *G. robertianum* z populacji występujących w terenie na torach kolejowych i w lasach. Badania biometryczne przeprowadzono w 16 populacjach torowych i 13 leśnych.

LICZBA LIŚCI

Liczba liści rozetowych u roślin *G. robertianum* z populacji torowych wynosiła najczęściej między 15 a 20 liści (FIG. 23A). Biorąc pod uwagę wszystkie rośliny *G. robertianum* z populacji torowych w rozetach tych roślin obserwowano średnio około 14 liści (FIG. 24). W populacjach leśnych liczba liści w rozetach nie przekraczała 10 (FIG. 23B). Analizując liczbę liści ze wszystkich badanych populacji leśnych w rozetach obserwowano średnio około 6 liści (FIG. 24). Najczęściej nie obserwowano różnic istotnych statystycznie w obrębie samych populacji torowych, ani w obrębie populacji leśnych (FIG. 23). Natomiast bardzo często obserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami torowymi i leśnymi. Wykazano, że obserwowane różnice pomiędzy wszystkimi populacjami torowymi i leśnymi były istotne statystycznie (FIG. 24).

Podsumowując, w rozetach roślin występujących na torach kolejowych obserwowano więcej liści niż w rozetach roślin występujących w lasach. Obserwowane różnice w liczbie liści pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi były istotne statystycznie.

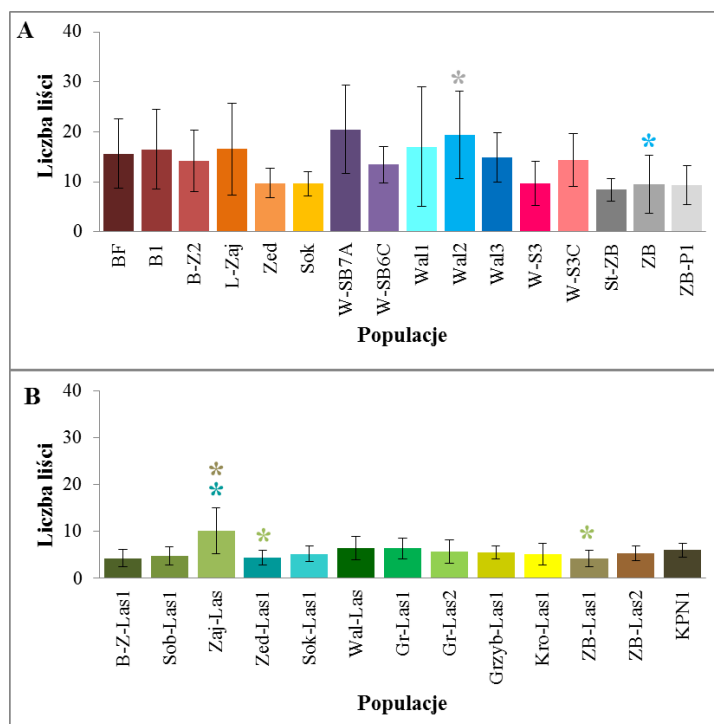


FIGURA 23. Liczba liści u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych (n=20 roślin w danej populacji). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy badanymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,05$).

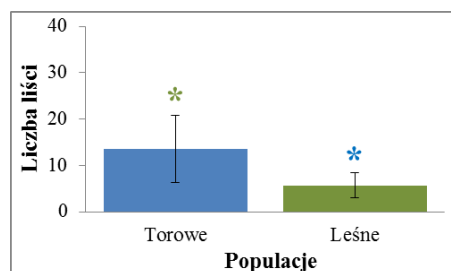


FIGURA 24. Liczba liści u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych (n=315 roślin) i leśnych (n=250 roślin), ze stanowisk terenowych. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,05$).

WIELKOŚĆ ROZET

W ramach przeprowadzonych badań oceniono wielkość rozet roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W populacjach *G. robertianum* zlokalizowanych na torach kolejowych dominowały osobniki średnie, małe i bardzo małe – łącznie stanowiły one zwykle ponad 50-60% osobników w populacji. Najwięcej osobników o bardzo małych rozetach zaobserwowano w populacji z miejscowości Waliły-Stacja z punktu przy stacji kolejowej – Wal3. W populacji B1 (zlokalizowanej tuż za Białymstokiem) obserwowano także niewielki procent osobników o bardzo dużych rozetach (FIG. 25A). Analizując wielkość rozet roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych łącznie zaobserwowano, że osobniki o rozetach: bardzo małych stanowią ~9,5%, małych ~29%, średnich ~39%, dużych ~22%, zaś bardzo dużych mniej niż 0,5% wszystkich osobników (FIG. 26).

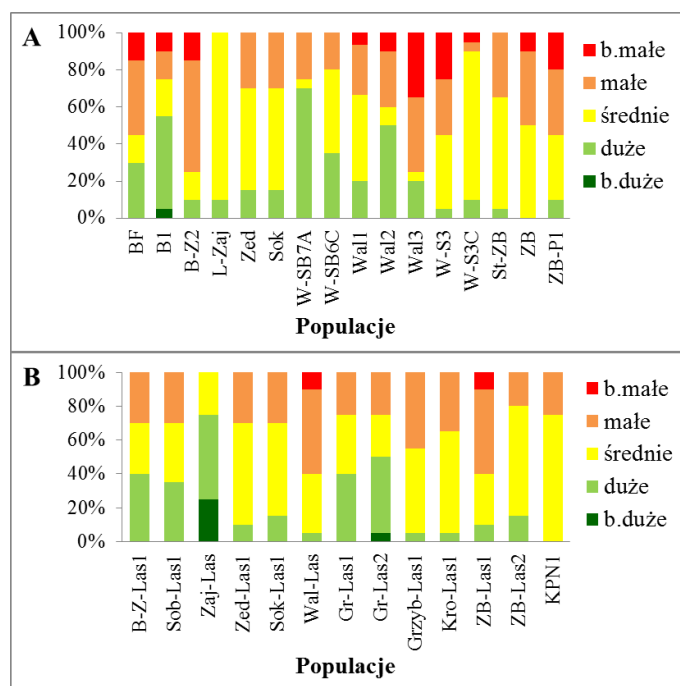


FIGURA 25. Wielkość rozet. Procentowy udział roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych (n=20 roślin w danej populacji), o rozetach: bardzo małych, małych, średnich, dużych i bardzo dużych.

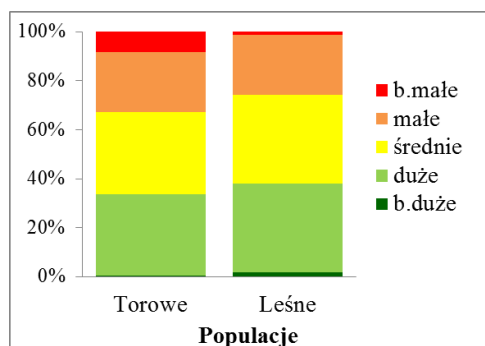


FIGURA 26. Wielkość rozet. Procentowy udział roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych (n=315 roślin) i leśnych (n=250 roślin), ze stanowisk terenowych, o rozetach: bardzo małych, małych, średnich, dużych i bardzo dużych.

W populacjach *G. robertianum* występujących w lasach obserwowano niewiele osobników o małych i bardzo małych rozetach. Zdecydowaną większość stanowiły tutaj osobniki średnie i duże (łącznie zazwyczaj około 60% osobników w populacji). W populacjach leśnych Zaj-Las oraz Gr-Las2 obserwowano także osobniki bardzo duże (FIG. 25B). W przypadku roślin z populacji leśnych zaobserwowano łącznie osobników o rozetach: bardzo małych ~1,6%, małych ~30,4%, średnich ~45,2%, dużych ~20,4% i bardzo dużych ~2,4% (FIG. 26).

Podsumowując, wykazano, że rozety roślin *G. robertianum* z populacji występujących na torach kolejowych były mniejsze w porównaniu do rozet roślin z populacji zlokalizowanych w lasach – zarówno pod względem wysokości roślin, jak i pod względem rozpiętości liści w rozetach (FIG. 26).

WIELKOŚĆ LIŚCI

W przypadku populacji *G. robertianum* występujących na torach kolejowych największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji B1, a najmniejsze rośliny z populacji Wal3. Różnice pomiędzy poszczególnymi z badanych parametrów u roślin z populacji B1 i Wal3 były istotne statystycznie. Również zaobserwowane różnice pomiędzy tymi populacjami a pozostałymi populacjami były w większości przypadków istotne statystycznie (FIG. 27-31).

Spośród populacji *G. robertianum* występujących w lasach największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji Zaj-Las, a najmniejsze rośliny z populacji Zed-Las1, Sok-Las1, Gr-Las1, Gr-Las2, Grzyb-Las1 i Kro-Las1. Różnice wymiarów blaszek liściowych roślin z populacji Zaj-Las i blaszek roślin z pozostałych populacji leśnych były w większości przypadków istotne statystycznie (FIG. 27-31).

Wielkość blaszek liściowych (szerokość, długość i powierzchnia) u roślin *G. robertianum* z populacji torowych w stosunku do wymiarów blaszek u roślin z populacji leśnych były w większości przypadków istotnie niższe (FIG. 31).

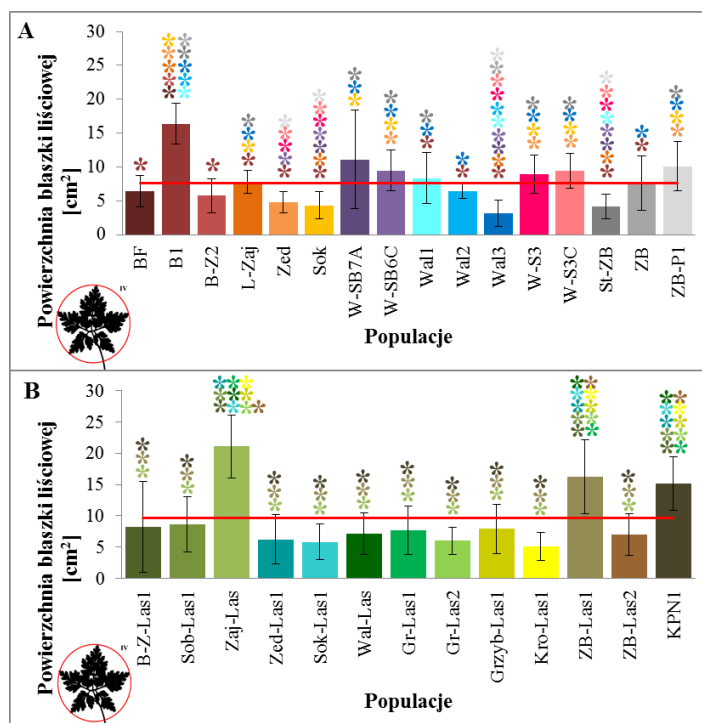


FIGURA 27. Powierzchnia blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 10 liści z trzech roślin z danej populacji (n=30). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

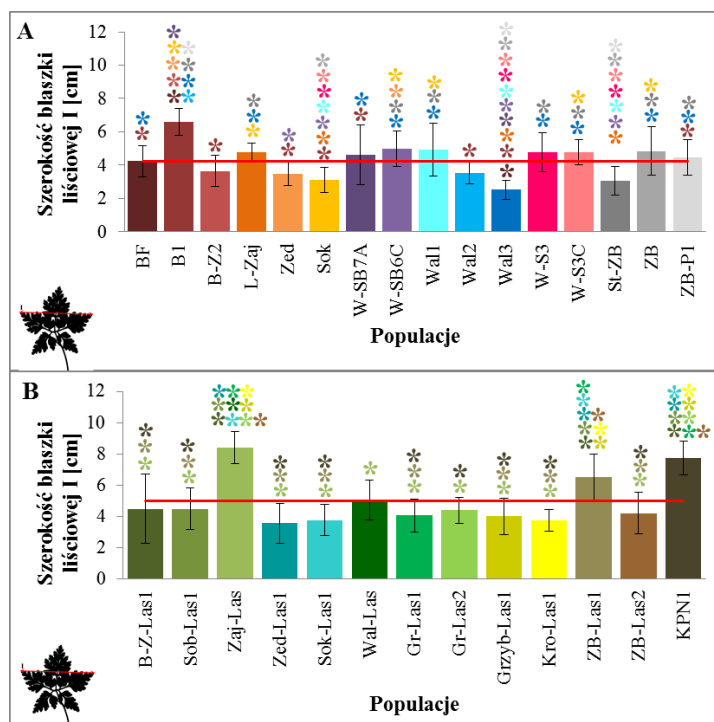


FIGURA 28. Szerokość I (górna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 10 liści z trzech roślin z danej populacji (n=30). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

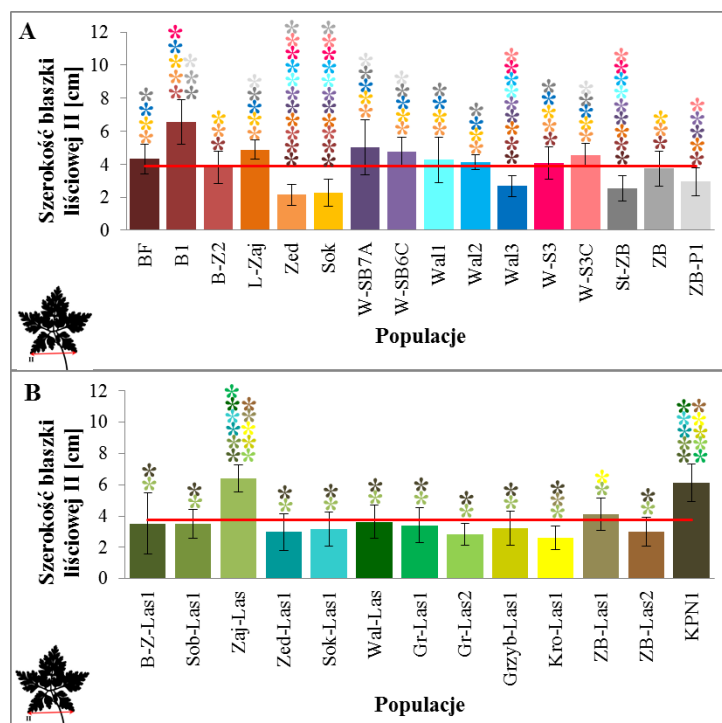


FIGURA 29. Szerokość II (dolna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 10 liści z trzech roślin z danej populacji (n=30). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

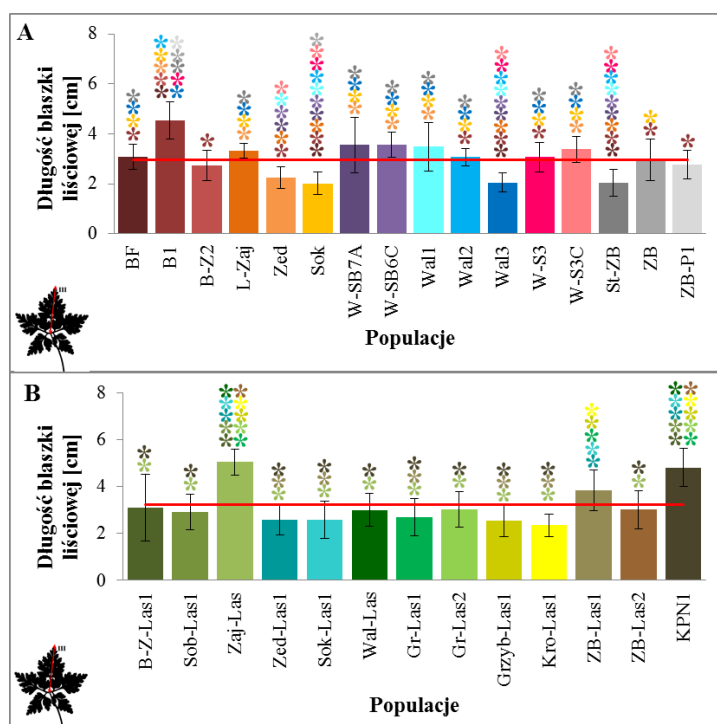


FIGURA 30. Długość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), ze stanowisk terenowych. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 10 liści z trzech roślin z danej populacji (n=30). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

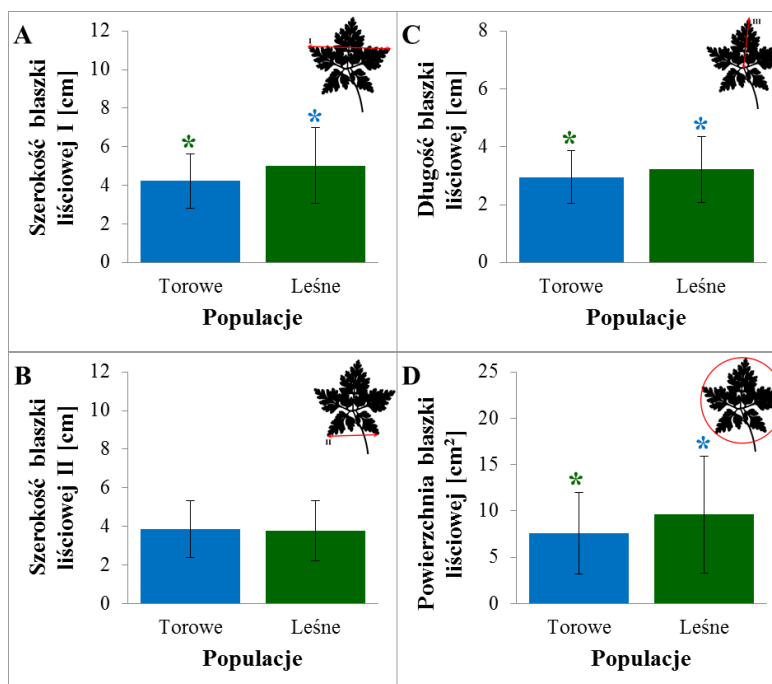


FIGURA 31. Wielkość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych i leśnych, ze stanowisk terenowych: szerokość I – górna (A) i II – dolna (B), długość (C), powierzchnia (D). Do badań wzięto 480 liści roślin z populacji torowych (n=480) i 390 liści z roślin z populacji leśnych (n=390). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

ANALIZA PCA – WIELKOŚĆ LIŚCI

Dla opisywanych parametrów biometrycznych (zmienne: szerokość blaszek liściowych w dwóch miejscach, długość blaszek liściowych oraz powierzchnia liści) roślin *G. robertianum* z terenu wykonano analizę składowych głównych (PCA). W TABELI 5 przedstawiono wartości własne macierzy korelacji. Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za ponad 92% informacji zawartych w zmiennych wejściowych.

TABELA 5. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o szerokości blaszek liściowych zmierzona w dwóch punktach, długości oraz powierzchni blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji badawczych, z terenu. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	3,698421	92,46052	3,698421	92,4605
2	0,219723	5,49308	3,918144	97,9536
3	0,062066	1,55165	3,980210	99,5053
4	0,019790	0,49475	4,000000	100,0000

Wszystkie badane parametry były ze sobą silnie skorelowane, jednak najmocniej – dane uzyskane z pomiarów „szerokości I” oraz „powierzchni” blaszek liściowych. Większość informacji zawartych w badanych zmiennych była przenoszona przez główne składowe (PC1 i PC2). Na FIGURZE 32 przedstawiono wyniki analizy PCA. Za położenie punktów w przestrzeni

na bardziej zacienionych stanowiskach. Także ogonki liściowe u roślin z populacji torowych były intensywnie czerwone lub niemal brunatne (TABLICA VI). W przypadku roślin z populacji leśnych niemal 100% osobników miało intensywnie zielone blaszki liściowe. Jedynie pojedyncze osobniki rosnące na stanowiskach bardziej nasłonecznionych miały czerwono-nabiegłe liście na końcach blaszek liściowych. Ogonki liściowe roślin z populacji leśnych były najczęściej jasno- lub średniozielone (TABLICA VII).

PODSUMOWANIE

Celem przeprowadzonych badań była ocena zróżnicowania fenotypowego roślin *G. robertianum* z populacji występujących na torach kolejowych i w lasach. Głównym wynikiem badań terenowych było wykazanie, że w terenie rośliny z populacji torowych istotnie różniły się od roślin z populacji leśnych. Poniżej przedstawiono najważniejsze wyniki:

- Rośliny z populacji torowych w stosunku do populacji leśnych były mniejsze (miały mniejsze rozety), ale u roślin *G. robertianum* z torów kolejowych występowała dwukrotnie większa liczba liści w rozetach niż u roślin z lasów.
- Liście roślin występujących na torach kolejowych były mniejsze i silnie zaczerwienione w porównaniu do liści roślin występujących w lasach, które były większe i intensywnie zielone. Wyniki analizy PCA oparte na pomiarach biometrycznych blaszek liściowych pozwoliły rozdzielić populacje *G. robertianum* na dwie grupy: populacje leśne i torowe. Potwierdzono zatem, że występują różnice w wielkości blaszek liściowych pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych.
- Wykazano, że warunki siedliskowe panujące na torach kolejowych były zdecydowanie różne od tych, które występują w lasach. Istotnym czynnikiem różnicującym oba typy siedlisk było natężenie światła – znacząco większe na torach kolejowych. Natężenie światła na stanowiskach torowych było 8 razy wyższe niż na stanowiskach leśnych, gdzie występowały rośliny *G. robertianum*.

Po przeanalizowaniu powyższych wyników nasuwa się pytanie – czy zróżnicowanie fenotypowe roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych jest wynikiem różnych warunków siedliskowych, czy też obserwowane różnice mają podłoże genetyczne. Odpowiedź na to pytanie znajduje się w dalszej części pracy.

IV.3. PORÓWNANIE ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH WYHODOWANYCH W JEDNAKOWYCH WARUNKACH SIEDLISKOWYCH

Celem przeprowadzonych badań była ocena zróżnicowania fenotypowego roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych hodowanych w szklarni, w jednakowych warunkach siedliskowych. Sprawdzano, czy różnice pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi, które wykazano w ramach badań terenowych, są spowodowane jedynie różnymi warunkami siedliskowymi, czy też różnice te wystąpią także przy jednakowych warunkach siedliskowych.

Do badań biometrycznych wykorzystano 13 populacji torowych oraz 6 populacji leśnych. Część nasion roślin z populacji torowych (BF, B1, B-Z2, L-Zaj, W-SB7A, W-SB6C, Wal1, Wal2, Wal3, W-S3, W-S3C i ZB) oraz leśnych (Zaj-Las, Wal-Las, KPN, Słowacja i Francja) było zebranych w terenie, w 2013 r. Dodatkowo, aby móc porównać uzyskane wyniki z badaniami WIERZBICKIEJ I IN. (2014) przebadano także opisywane w tej pracy populacje *G. robertianum*, których nasiona zebrano w 2008 r. – populacje torową z Walił-Stacji (o oznaczeniu Wal-St (2008)) oraz populację z lasu za Zajeziernicami (Zaj-Las (2008)).

KIELKOWANIE NASION

W pierwszej kolejności sprawdzono zdolność kiełkowania nasion roślin *G. robertianum*. Najwyższy procent kiełkujących nasion (~60%), wysianych kilka miesięcy po zbiorze w 2013 r., zaobserwowano w populacjach torowych z początku linii kolejowej nr 37 (BF, B-Z2) oraz w populacji leśnej z Francji. W populacjach torowych procent kiełkujących nasion mieścił się w przedziale od 20 do 60%. W przypadku populacji leśnych procent kiełkujących nasion mieścił się w przedziale od 3 do 20%. Wykazano, że nasiona roślin z populacji torowych, w większości przypadków kiełkują lepiej niż nasiona roślin z populacji leśnych.

Zbadano także zdolność kiełkowania nasion z populacji torowej z Walił-Stacji oraz leśnej z Zajeziernic z 2008 r. Wyższy procent kiełkujących nasion wystąpił w populacji torowej Wal-St (2008) (do 62%) niż w populacji leśnej Zaj-Las (2008) (do 27%). Procent kiełkujących nasion był dwukrotnie wyższy w populacji torowej, niż leśnej. W populacji torowej stwierdzono szybsze kiełkowanie nasion – większość wykiełkowała w przeciągu tygodnia od wysiania, w porównaniu do populacji leśnej, gdzie nasiona kiełkowały stopniowo i równomiernie począwszy od drugiego dnia od wysiania aż do końca trwania testu.

POKRÓJ OGÓLNY ROŚLIN

W trakcie hodowli szklarniowej zaobserwowano różnice pomiędzy badanymi populacjami. Rośliny *G. robertianum* z populacji torowych miały nieco gęstsze i mniej rozłożyste rozety w porównaniu do roślin z populacji leśnych (TABLICA VIII). Obserwowane różnice w pokroju roślin z hodowli szklarniowej, z obu typów populacji hodowanych w szklarni nie były jednak tak duże, jak w przypadku pokroju roślin z populacji torowych i leśnych obserwowanych w terenie. Jedynie rośliny z populacji Wal-St (2008) wyróżniały się znacząco od innych populacji torowych i leśnych. Rośliny *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) były mniejsze od roślin z populacji Zaj-Las (2008) oraz roślin z pozostałych populacji torowych i leśnych. Blaszki liściowe roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) były ciemniejsze, mniejsze i bardziej powcinane niż blaszki roślin z populacji leśnej Zaj-Las (2008) oraz z pozostałych populacji (TABLICA IX, X).

W celu sprawdzenia, czy obserwowane różnice pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) a roślinami z pozostałych populacji torowych i leśnych były istotne statystycznie przeprowadzono dokładne pomiary biometryczne.

LICZBA LIŚCI

Po około 3 miesiącach hodowli liczba liści na roślinach *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych była dość zróżnicowana. Najwięcej liści w rozetach (~13-18 liści) obserwowano w populacjach torowych z początkowego odcinka linii kolejowej nr 37, w populacji: BF, B1, B-Z2 i L-Zaj. Rośliny *G. robertianum* z populacji ze środkowego i końcowego odcinka linii nr 37, miały średnio po 3 miesiącach 8-12 liści w rozecie (FIG. 33A). W przypadku populacji leśnych po około 3 miesiącach najwięcej liści w rozetach roślin *G. robertianum* obserwowano w populacji Zaj-Las (około 15 liści). W populacji leśnej Wal-Las ze środkowego odcinka badanego obszaru obserwowano średnio około 14 liści w rozetach. W populacjach leśnych KPN1, Francja i Słowacja, które stanowiły punkty porównawcze dla badanego obszaru, średnia liczba liści w rozetach roślin *G. robertianum* wynosiła odpowiednio – 8, 11 i 6 (FIG. 33B). Po 3 miesiącach hodowli średnia liczba liści w rozetach roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych, wyhodowanych z nasion zebranych w 2013 r., wyniosła około 12 liści (FIG. 33A), podobnie jak w przypadku roślin z populacji leśnych (FIG. 33B). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą populacji torowych i grupą populacji leśnych.

Po około 6 miesiącach hodowli w przypadku populacji torowych największą liczbę liści miały rośliny *G. robertianum* z populacji: B1 (~46 liści), B-Z2 (~44 liści), L-Zaj (~40 liści), W-SB6C (~40 liści) i W-S3C (~42 liści). Były to populacje zlokalizowane na początku, środku i na końcu linii kolejowej nr 37. Rośliny *G. robertianum* z pozostałych populacji torowych miały zwykle 40 lub mniej liści w rozecie. Najmniej liści obserwowano u roślin ze środkowego odcinka linii kolejowej z populacji Wal1 i Wal2 – po około 27 liści w rozetach. Zaobserwowana różnica w liczbie liści u roślin z populacji Wal1 i Wal2 była istotna statystycznie w stosunku do większości pozostałych populacji torowych, poza populacjami W-SB7A i W-S3 (FIG. 33C). Liczba liści u badanych roślin z populacji leśnych obserwowana po 6 miesiącach hodowli była najwyższa w populacjach Wal-Las (~47 liści) i Zaj-Las (~39 liści). W populacjach leśnych stanowiących punkt odniesienia dla badanego obszaru liczba liści w rozetach była niższa i wynosiła odpowiednio około 30 liści w populacji KPN1, 25 liści w populacji ze Słowacji i 34 liście w populacji z Francji. Różnice w liczbie liści pomiędzy populacją Wal-Las a populacjami KPN1, Francja i Słowacja były istotne statystycznie (FIG. 33D). Po 6 miesiącach hodowli liczba liści u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 38 liści (FIG. 33C), zaś w przypadku populacji leśnych około 37 liści (FIG. 33D). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie pomiędzy grupą populacji torowych i grupą populacji leśnych.

Różnice istotne statystycznie wystąpiły natomiast w przypadku roślin *G. robertianum* wyhodowanych z nasion zebranych w 2008 r. Po 3 miesiącach hodowli w szklarni liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) wynosiła około 18, a u roślin z populacji leśnej Zaj-Las (2008) około 15 (FIG. 34A). Po 6 miesiącach hodowli w szklarni liczba liści u roślin z populacji Wal-St (2008) wyniosła około 29, a w populacji Zaj-Las (2008) około 20 liści (FIG. 34B). Zaobserwowane różnice były istotne statystycznie.

Podsumowując, zarówno po pierwszym, jak i drugim pomiarze roślin *G. robertianum* więcej liści w rozetach obserwowano w populacji torowej Wal-St (2008), niż leśnej Zaj-Las (2008). Wynik ten był zgodny z wynikami uzyskanymi dla wcześniej opisanych populacji torowych i leśnych, jednak w tym przypadku po 6 miesiącach hodowli obserwowane różnice w liczbie liści pomiędzy populacją torową z Wali i leśną z Zajezierec był istotny statystycznie.

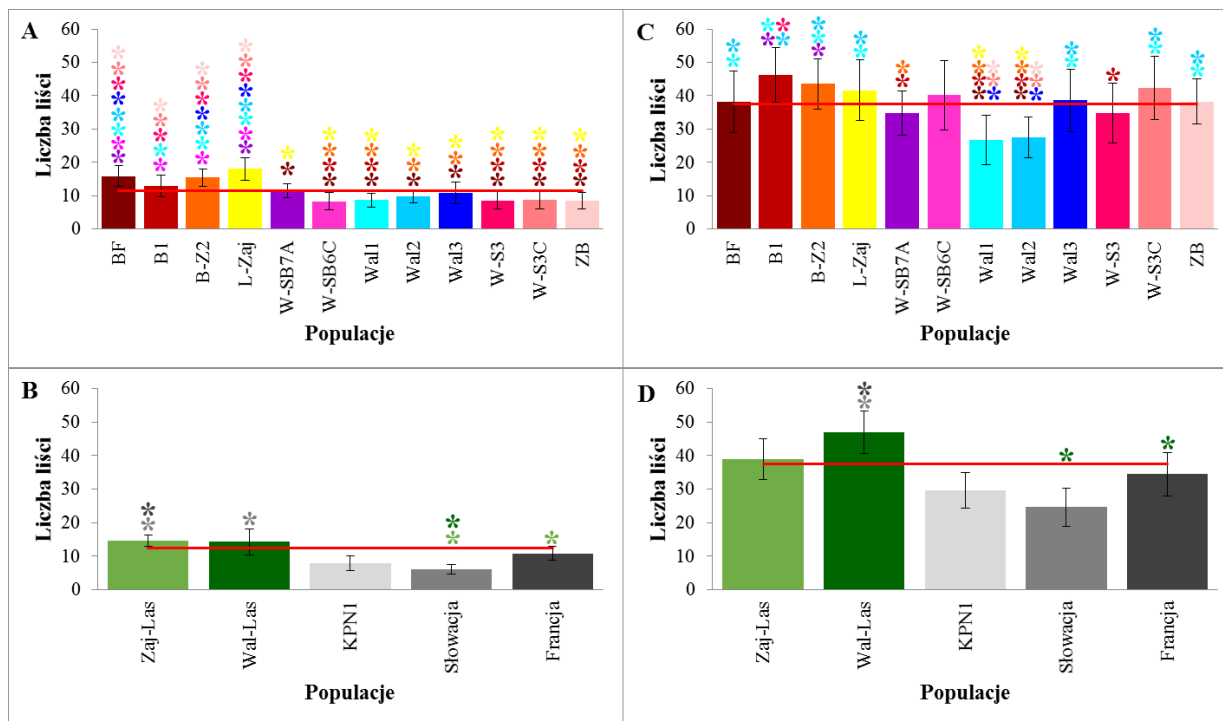


FIGURA 33. Liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A, C) i leśnych (B, D) w wieku 3 miesięcy (A, B) i 6 miesięcy (C, D). Czerwonymi liniami zaznaczono średnią liczbę liści u roślin z populacji torowych i leśnych. Do badań brano od 5 do 35 osobników z danej populacji – pomiar I: osobniki z populacji torowych $n=409$ i leśnych $n=96$, pomiar II: osobniki z populacji torowych $n=408$ i leśnych $n=93$. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

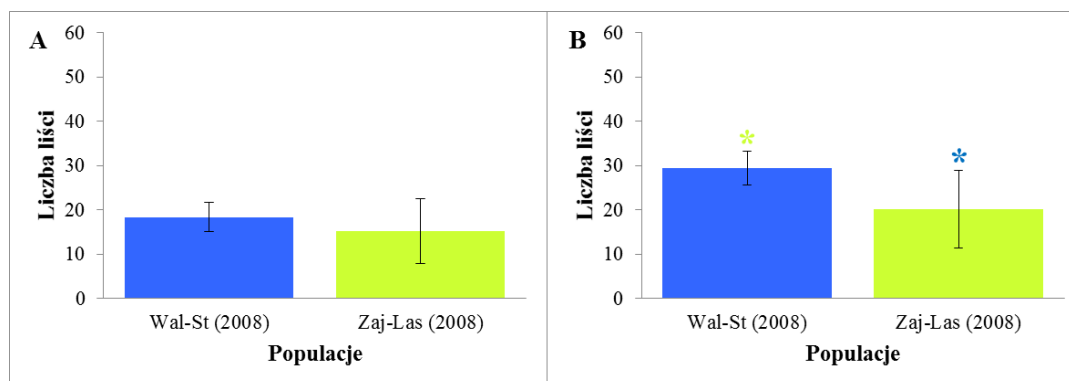


FIGURA 34. Liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) i leśnej Zaj-Las (2008) w wieku 3 miesięcy (A) i 6 miesięcy (B). Do badań użyto – pomiar I: osobniki z populacji torowej $n=54$ i leśnej $n=30$, pomiar II: osobniki z populacji torowej $n=52$ i leśnej $n=13$. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

DŁUGOŚĆ OGONKÓW LIŚCIOWYCH

Kolejnym z badanych parametrów biometrycznych była długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W przypadku roślin *G. robertianum* z populacji torowych, po 3 miesiącach hodowli długość ogonków liściowych wynosiła od około 12 cm (populacja B1) do około 7 cm (populacja W-SB6C) (FIG. 35A). Długość ogonków liściowych u roślin z populacji leśnych, po 3 miesiącach hodowli w populacjach Zaj-Las i Francja wyniosła około 10,5 cm, a w populacji Wal-Las około 10 cm. W populacjach Słowacja i KPN1 długość ogonków liściowych wyniosła odpowiednio około 7 cm i 6 cm (FIG. 35B). Po 3 miesiącach hodowli długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 9 cm (FIG. 35A), zaś u roślin ze wszystkich populacji leśnych – około 10 cm (FIG. 35B). Różnica w długości ogonków liściowych pomiędzy populacjami torowymi a leśnymi okazała się istotna statystycznie.

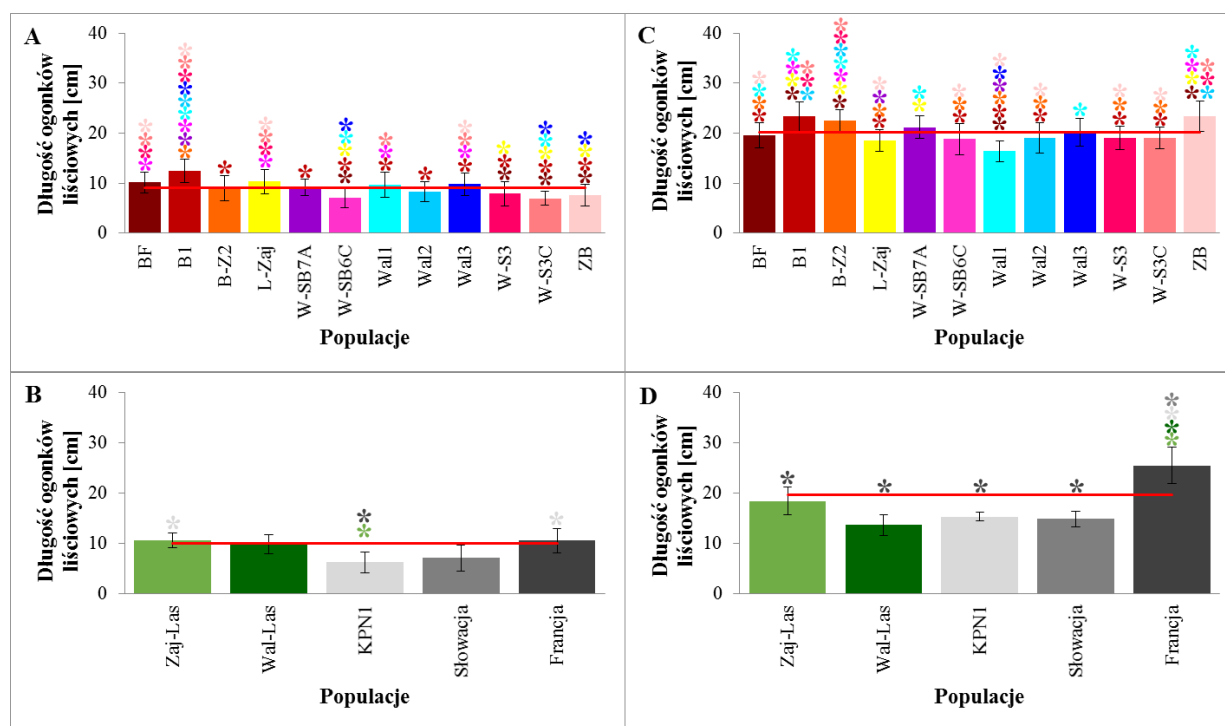


FIGURA 35. Długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A, C) i leśnych (B, D) w wieku 3 miesięcy (A, B) i 6 miesięcy (C, D). Czerwonymi liniami zaznaczono średnią liczbę liści u roślin z populacji torowych i leśnych. Do badań brano od 5 do 35 osobników z danej populacji, przy pomiarze I brano po 5 największych liści a przy pomiarze II po 10 liści – pomiar I: osobniki z populacji torowych n=409 (n liści=2045) i leśnych n=96 (n liści=480), pomiar II: osobniki z populacji torowych n=408 (n liści=4080) i leśnych n=93 (n liści=930). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

Po 6 miesiącach, w populacjach torowych najkrótsze ogonki liściowe miały rośliny z populacji Wal1 (około 16 cm) a najdłuższe z populacji B1 i ZB (około 23 cm). Długość ogonków liściowych u roślin z pozostałych populacji torowych wyniosła ~20 cm. Wykazano różnice istotne statystycznie tylko pomiędzy populacjami torowymi o najdłuższych ogonkach liściowych a populacjami o najkrótszych ogonkach liściowych (FIG. 35C). Po 6 miesiącach, długość ogonków liściowych w populacjach leśnych była najwyższa w populacji z Francji

i wynosiła 25,5 cm. Długość ogonków liściowych u roślin z pozostałych populacji leśnych oscylowała w granicach około 14-18 cm, przy czym najmniejszą długość obserwowano w populacji Wal-Las. Różnice w długości ogonków liściowych pomiędzy populacją z Francji a pozostałymi populacjami były istotne statystycznie (FIG. 35B). Po 6 miesiącach długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła 20,09 cm (FIG. 35C), zaś u roślin z populacji leśnych 19,67 cm (FIG. 35D). Różnica w długości ogonków liściowych pomiędzy populacjami torowymi a leśnymi okazała się nieistotna statystycznie.

W oparciu o badane parametry biometryczne, dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych, wyhodowanych z nasion zebranych w 2013 r., wykonano analizy składowych głównych (PCA). Zmiennymi były liczba liści i długości ogonków liściowych. Jednak zarówno po 3, jak i 6 miesiącach hodowli szklarniowej badane parametry nie pozwoliły na rozdzielenie roślin na grupę populacji torowych oraz grupę populacji leśnych.

Różnice istotne statystycznie w długości ogonków liściowych wystąpiły natomiast pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji z Wali i Zajezierec, wyhodowanych z nasion zebranych w 2008 r. Po 3 miesiącach hodowli, długość ogonków liściowych u roślin z populacji Wal-St (2008) wynosiła średnio 16,48 cm. Natomiast długość ogonków liściowych u roślin z populacji Zaj-Las (2008) wynosiła 13,20 cm (FIG. 36A). Długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum*, po 6 miesiącach hodowli w szklarni, dla populacji Wal-St (2008) wyniosła 17,75 cm. Natomiast w przypadku roślin z w populacji Zaj-Las (2008) wyniosła 9,83 cm (FIG. 36B). Wynik ten zatem odbiegał od wyniku uzyskanego dla pozostałych populacji torowych i leśnych, pomiędzy którymi nie wykazano różnic istotnych statystycznie w długości ogonków liściowych.

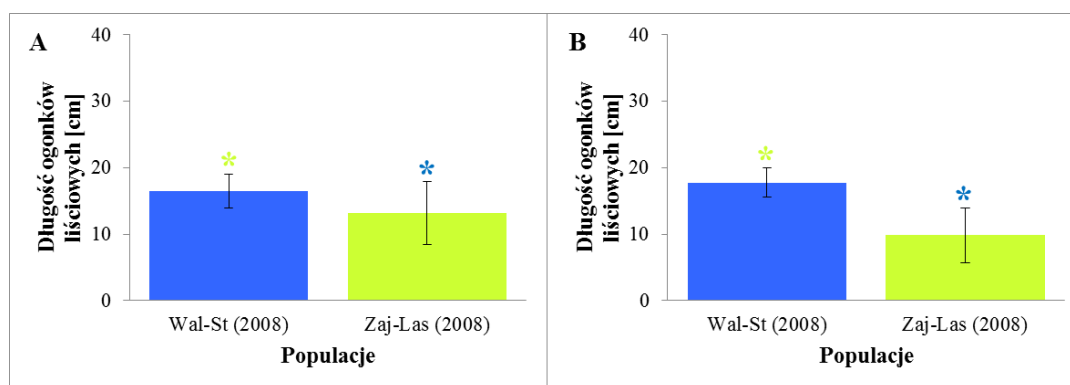


FIGURA 36. Długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) i leśnej Zaj-Las (2008) w wieku 3 miesięcy (A) i 6 miesięcy (B). Do badań użyto – pomiar I: osobniki z populacji torowej n=54 (n liści=270) i leśnej n=30 (n liści=150), pomiar II: osobniki z populacji torowej n=52 (n liści=520) i leśnej n=13 (n liści=130). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

WIELKOŚĆ LIŚCI

Dotychczas opisane parametry biometryczne – liczba liści i długość ogonków liściowych, pozwoliły wyróżnić jedynie populację Wal-St (2008) spośród pozostałych populacji. Natomiast badane parametry nie pozwoliły podzielić badanych populacji *G. robertianum* na grupę populacji

torowych i leśnych. Dlatego też dla roślin *G. robertianum* wyhodowanych z nasion zebranych w 2013 r. przebadano dodatkowy parametr jakim była wielkość liści. Spośród populacji torowych największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji L-Zaj i Wal1, a najmniejsze rośliny z populacji BF, B-Z2, W-SB7A i W-SB6C. Zróżnicowanie wielkości blaszek liściowych u roślin z populacji torowych było niewielkie i w znacznej części przypadków nieistotne statystycznie (FIG. 37-40). W przypadku populacji leśnych największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji Francja, a najmniejsze rośliny z populacji Wal-Las. Różnice wymiarów blaszek liściowych roślin z populacji Francja i Wal-Las oraz blaszek roślin z pozostałych populacji leśnych były w większości przypadków istotne statystycznie (FIG. 37-40).

Średnie wymiary blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji leśnych w stosunku do wymiarów blaszek u roślin z populacji torowych były dość zbliżone. Obserwowane różnice w wielkości blaszek liściowych u roślin z obu typów populacji były w większości przypadków nieistotne statystycznie (FIG. 41). W oparciu o badane parametry biometryczne, dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych, wyhodowanych z nasion zebranych w 2013 r., wykonano analizy składowych głównych (PCA). Zmiennymi były: szerokość blaszek liściowych zmierzona w dwóch miejscach, długość blaszek liściowych oraz powierzchnia liści. W tym przypadku, analiza wymiarów blaszek liściowych nie pozwoliła na rozdzielenie roślin *G. robertianum* na grupę populacji torowych oraz grupę populacji leśnych.

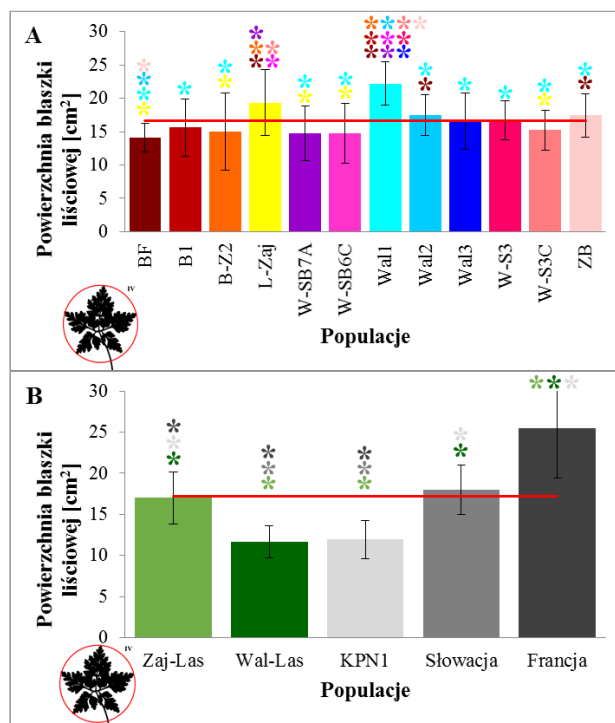


FIGURA 37. Powierzchnia blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

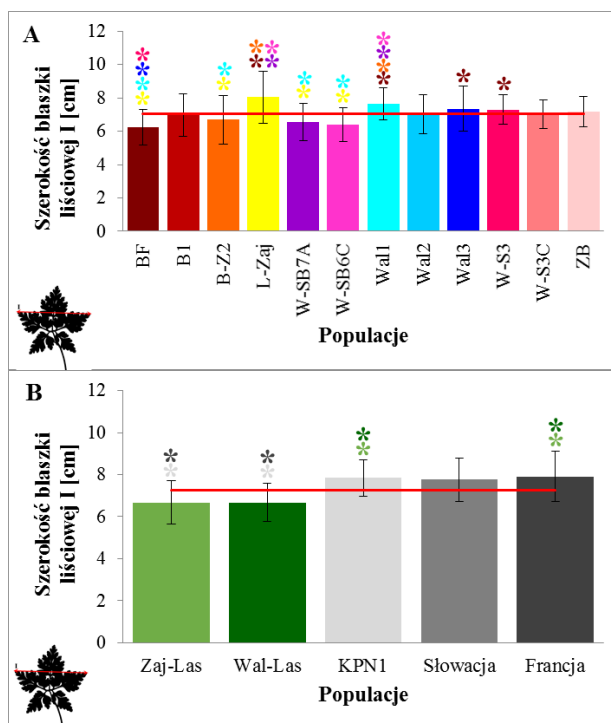


FIGURA 38. Szerokość I (górna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

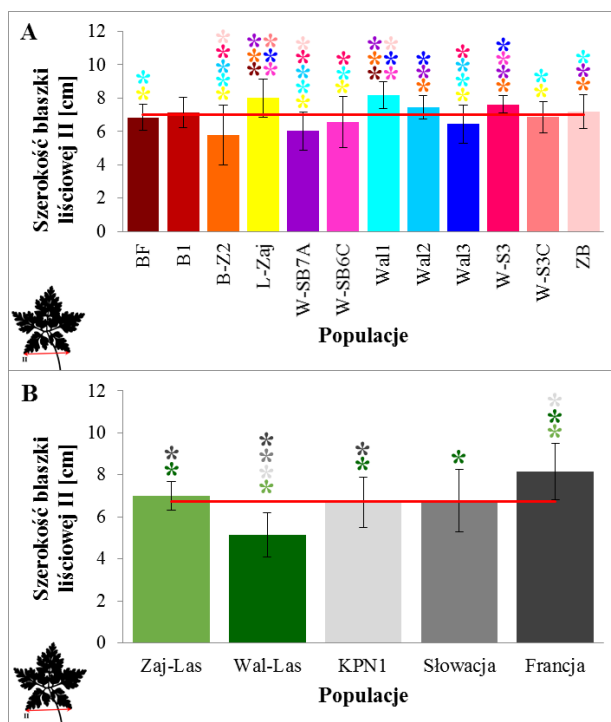


FIGURA 39. Szerokość II (dolna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

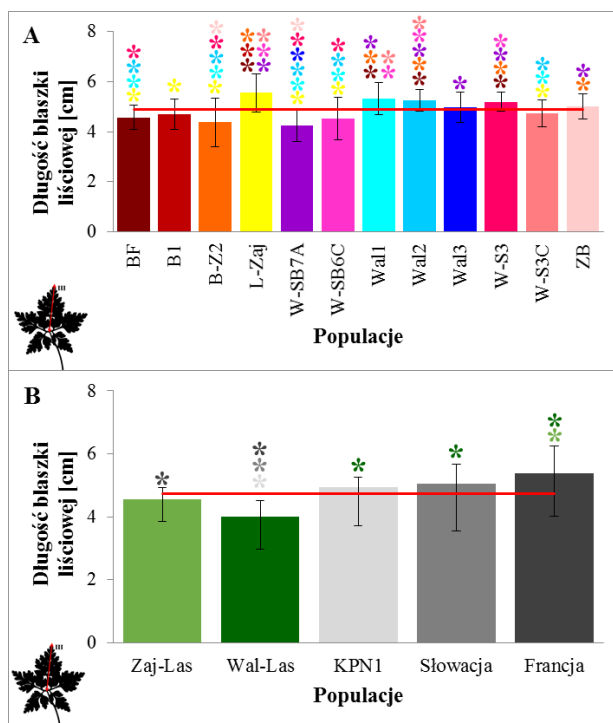


FIGURA 40. Długość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallis; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

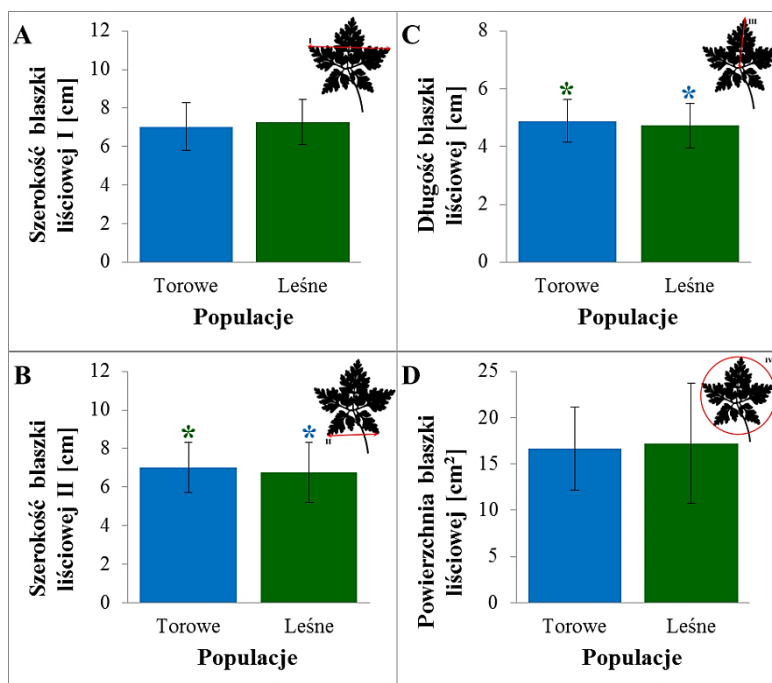


FIGURA 41. Wielkość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych i leśnych, w wieku 6-6,5 miesiąca: szerokość I – górna (A) i II – dolna (B), długość (C), powierzchnia (D). Do badań wzięto 600 liści z populacji torowych (n=600) i 250 liści z populacji leśnych (n=250). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi (testy Kruskala-Wallis i U Manna-Whitney; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

Wielkość liści zbadano także dla roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) i leśnej Zaj-Las (2008). Wykazano, że blaszki liściowe roślin *G. robertianum* z populacji Wal-St (2008) były najmniejsze spośród wszystkich badanych blaszek liściowych roślin z populacji torowych i leśnych oraz bardziej powcinane (patrz rozdział: IV.4.).

KOLOR BLASZEK LIŚCIOWYCH

Podczas hodowli roślin w jednakowych warunkach zaobserwowano, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych miały liście ciemniejsze w porównaniu do roślin z populacji leśnych, jednak obserwowane różnice były nieznaczne. Jedynie rośliny z populacji torowej Wal-St (2008) wyróżniały się spośród roślin z pozostałych badanych populacji torowych i leśnych. Poniżej przedstawiono wybrane wyniki koloru blaszek liściowych dla roślin z populacji torowej Wal-St (2008) i leśnej Zaj-Las (2008) (FIG. 42).

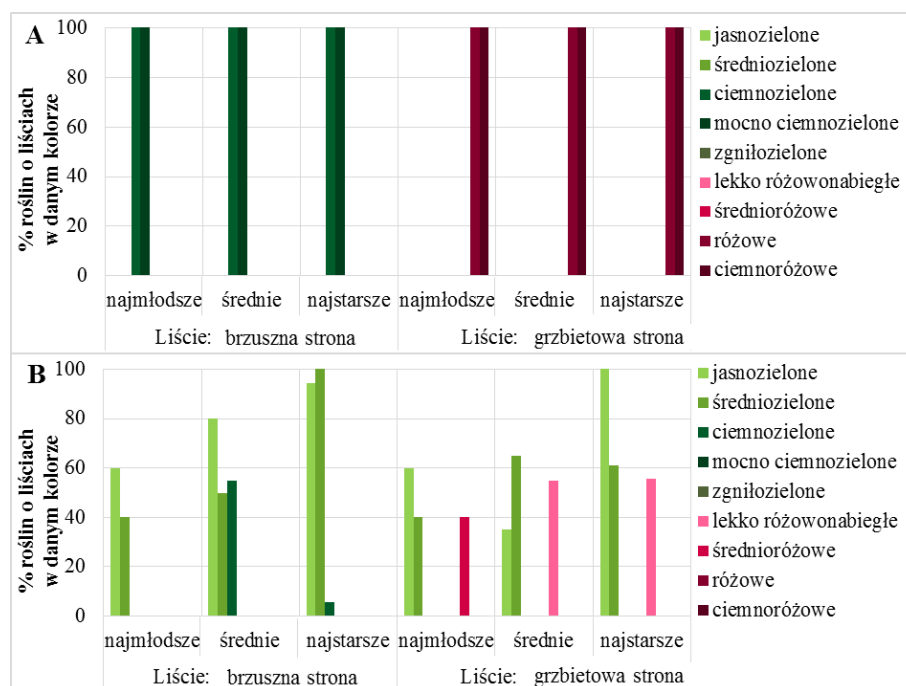


FIGURA 42. Liczba roślin [%] *G. robertianum* o liściach w danym kolorze, z populacji torowej Wal-St (2008) (A) i leśnej Zaj-Las (2008) (B). Oceniano kolor brzuszej i grzbietowej strony blaszek liściowych, oddzielnie u liści najmłodszych, w średnim wieku (środkowe okółki rozet) oraz liści najstarszych. Wiek roślin 6 miesięcy. Do badań użyto: osobniki z populacji torowej n=52 i leśnej n=13.

Liście roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) niezależnie od wieku miały brzuszną stronę blaszek liściowych ciemnozieloną i mocno ciemnozieloną, zaś grzbiet blaszek liściowych różowy i ciemnoróżowy. Liście roślin z populacji z Walil były zdecydowanie ciemniejsze niż liście roślin z populacji leśnej. Ponadto barwa liści w różnym wieku w populacji Wal-St (2008) była zdecydowanie bardziej jednolita niż u roślin z populacji leśnej Zaj-Las (2008), gdzie w zależności od wieku liści ich kolor był bardziej zróżnicowany (FIG. 42A). W populacji leśnej Zaj-Las (2008) brzusza strona najmłodszych liści była jasno- lub średniozielona. Podobnie wyglądała grzbietowa strona blaszek liściowych najmłodszych liści

u roślin z Zajezierec, przy czym obserwowano na niektórych liściach średnioróżowe zabarwienie blaszek (najczęściej na brzegach liści). W populacji Zaj-Las (2008) brzuszna i grzbietowa strona blaszek liści ze środkowych okółków oraz najstarszych liści była najczęściej jasno- lub średniozielona. Obserwowano też na niektórych liściach lekko różowonabiegle zabarwienie na brzegach blaszek liściowych (FIG. 42B).

ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW

Sprawdzono zawartość antocyjanów w liściach roślin *G. robertianum* z różnych populacji torowych: Wal-St (2008), Wal-St-rampa (2015/16), BF (2013), ZB (2013), oraz różnych populacji leśnych: Zaj-Las (2014), Gr-Las1 (2015). Zarówno w przypadku blaszek liściowych, jak i ogonków liściowych roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji zaobserwowano wyższy poziom antocyjanów w populacjach torowych niż w populacjach leśnych (FIG. 43).

Najwyższy poziom antocyjanów w liściach obserwowano w populacji torowej Wal-St (2008) a najniższy w populacji leśnej Gr-Las1 (2015) (FIG. 43). Pomiedzy populacją torową Wal-St (2008) a oboma populacjami leśnymi zaobserwowane różnice w zawartości antocyjanów w blaszkach liściowych były istotne statystycznie (FIG. 43A). W przypadku zawartości antocyjanów w ogonkach liściowych wszystkie populacje torowe różniły się istotnie od populacji leśnych (FIG. 43B). Nie wykazano różnic istotnych statystycznie w obrębie populacji torowych, ani w obrębie populacji leśnych. Obserwowane różnice pomiędzy całością populacji torowych i całością populacji leśnych były istotne statystycznie (FIG. 43).

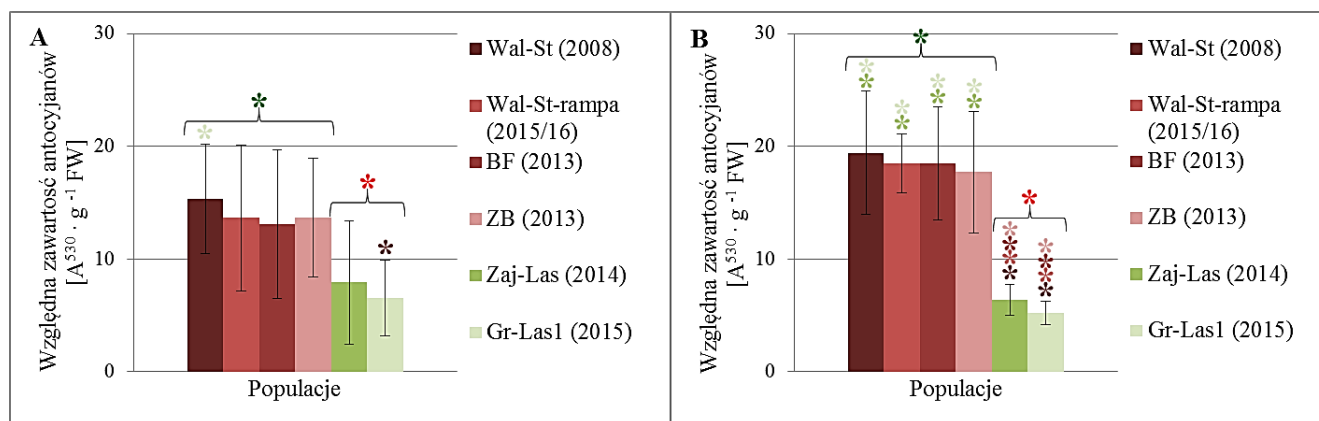


FIGURA 43. Względna zawartość antocyjanów [$A^{530} \cdot g^{-1} FW$] w blaszkach (A) i ogonkach liściowych (B) roślin *G. robertianum* z populacji torowych: Wal-St (2008), Wal-St-rampa (2015/16), BF (2013), ZB (2013), oraz populacji leśnych: Zaj-Las (2014), Gr-Las1 (2015). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi; klamrą i gwiazdką oznaczono różnice istotne statystycznie dla danego typu populacji (torowe / leśne) (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,05$).

Wykonano analizę PCA w celu rozpoznania zależności w zawartości antocyjanów w roślinach *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. Zmiennymi były względna zawartość antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych roślin z poszczególnych populacji. W TABELI 6 przedstawiono wartości własne macierzy korelacji oraz statystyki pokrewne. Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za niemal 97% informacji zawartych w zmiennych wejściowych.

TABELA 6. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o względnej zawartości antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych roślin *G. robertianum* z populacji badawczych. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	1,939837	96,99186	1,939837	96,9919
2	0,060163	3,00814	2,000000	100,0000

Położenie punktów w przestrzeni PC1 i PC2 zmienne określały po równo. Na wykresie przedstawiającym populacje badawcze w przestrzeni dwóch głównych składowych widać, że populacje można podzielić na trzy grupy. Pierwszą grupę oznaczoną zielonym okręgiem utworzyły rośliny z populacji leśnych Zaj-Las (2014) i Gr-Las1 (2015), których blaszki i ogonki liściowe zawierały mniej antocyjanów niż populacje torowe. Drugą grupę oznaczoną niebieskim okręgiem utworzyły rośliny z populacji torowych ZB (2013), Wal-St-rampa (2015/16) i BF (2013), które w blaszkach i ogonkach liściowych zawierały średnią ilość antocyjanów. Ostatnią grupę oznaczoną różowym okręgiem stanowiły rośliny z populacji torowej Wal-St (2008), które zawierały najwięcej antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych (FIG. 44).

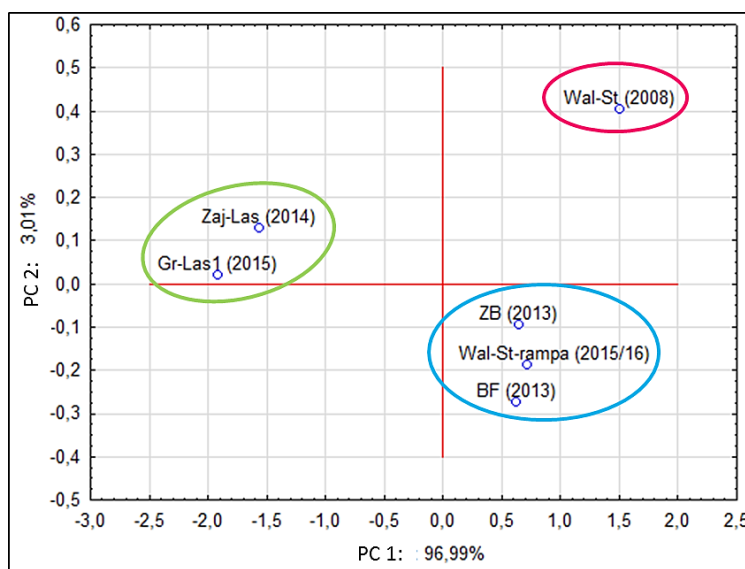


FIGURA 44. Analiza składowych głównych (PCA) przeprowadzona na macierzy zawierającej dane o względnej zawartości antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych roślin *G. robertianum* z populacji badawczych. Wykres przedstawia położenie punktów odpowiadających analizowanym przypadkom w przestrzeni pierwszej (PC1) i drugiej (PC2) głównej składowej, wyjaśniających odpowiednio 96,99% i 3,01% ogólnej wariancji. Zielonym, niebieskim i różowym okręgiem oznaczono wyodrębnione grupy populacji.

WARUNKI PANUJĄCE W SZKLARNI

Natężenie światła w szklarni było wyrównane i wynosiło średnio prawie 68000 lx. Pozostałe parametry monitorowane w szklarni – temperatura i wilgotność, także były względnie stałe. Temperatura w szklarni wynosiła $+25 \pm 5^{\circ}\text{C}$, zaś wilgotność $50 \pm 15\%$. Podsumowując, warunki siedliskowe panujące w szklarni były dla wszystkich hodowanych tam roślin *G. robertianum* jednakowe. Zatem nie miały one wpływu na uzyskane wyniki.

PODSUMOWANIE

Celem przeprowadzonych badań była ocena zróżnicowania fenotypowego roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych hodowanych w szklarni, w jednakowych warunkach. Poniżej przedstawiono najważniejsze wyniki z przeprowadzonych badań.

Badane parametry biometryczne (liczba liści, długość ogonków liściowych, wielkość liści, kolor blaszek liściowych) nie pozwoliły wyróżnić poszczególnych populacji roślin *G. robertianum*, wyhodowanych z nasion zebranych w 2013 r., na grupę populacji torowych i leśnych. Wynik ten potwierdziły przeprowadzone analizy PCA. Jedynie populacja torowa z Walił-Stacji, której nasiona zebrano w 2008 r., wyróżnia się spośród badanych populacji. Rośliny z populacji Wal-St (2008) były mniejsze od roślin z innych populacji torowych i leśnych. Wykazano ponadto różnice w kolorze, kształcie i wielkości ich blaszek liściowych w porównaniu do roślin z pozostałych populacji. Liście roślin z populacji Wal-St (2008) były zdecydowanie ciemniejsze, mniejsze i bardziej powcinane w porównaniu do liści roślin z pozostałych populacji.

Najwyższy poziom antocyjanów obserwowano w liściach roślin z populacji torowej Wal-St (2008). Wyższą zawartość antocyjanów, zarówno w blaszkach liściowych, jak i ogonkach liściowych, miały rośliny z populacji torowych, a niższą rośliny z populacji leśnych. Wyniki analizy PCA pozwoliły wyodrębnić rośliny z populacji torowej Wal-St (2008), jako odrębną grupę – wyróżniającą się na tle innych populacji torowych i leśnych.

Rośliny z Walił-Stacji, których nasiona zebrano w 2013 r. nie wyróżniały się spośród innych populacji, tak jak to miało miejsce w przypadku roślin z Walił, których nasiona zebrano w 2008 r. Z tego powodu, w ramach dalszych badań, postanowiono sprawdzić, czy na przestrzeni kilku lat mogły wystąpić zmiany morfologiczne roślin z populacji torowej z Walił-Stacji.

IV.4. PORÓWNANIE POPULACJI TOROWYCH Z WALIŁ Z POPULACJAMI LEŚNYMI Z ZAJEZIERC WYHODOWANYCH Z NASION ZEBRANYCH W RÓŻNYCH LATACH

Przeprowadzono hodowle w szklarni roślin *G. robertianum* w celu porównania zróżnicowania fenotypowego roślin. Do badań biometrycznych wykorzystano rośliny z populacji torowych z miejscowości Waliły-Stacja, oraz z populacji leśnych z lasu za wsią Zajezierce. Rośliny wyhodowano z nasion zebranych w różnych latach – 2008 (nasiona 7 letnie), 2013 (nasiona 2 letnie), 2014 (nasiona roczne) i 2015 r. (nasiona ~2 miesięczne).

KIELKOWANIE NASION

Najwyższy procent kielkujących nasion wystąpił w populacji torowej Wal-St (2008) i wyniósł on 69% (nasiona 7 letnie). W porównaniu do populacji leśnej z Zajezierc z 2008 roku procent kielkujących nasion w populacji Wal-St (2008) był trzykrotnie wyższy. W przypadku populacji leśnych, najwyższy procent kielkujących nasion zaobserwowano w populacjach z 2013 r. (49%) i 2014 r. (48,5%) – nasiona 2 letnie i roczne (FIG. 45). Zarówno w przypadku populacji torowych z Walił, jak i leśnych z Zajezierc zaobserwowano, że im krótszy czas między

wysianiem nasion (test prowadzono w 2015 roku) a ich zebraniem, tym nasiona słabiej kiełkują. Jedynym wyjątkiem była populacja Zaj-Las (2008), którą pomimo dłuższej przerwy między zebraniem a wysianiem nasion, charakteryzowała niższa siła kiełkowania nasion niż populacje leśne z Zajezierec z 2013 i 2014 r. (FIG. 45). Podsumowując, najlepiej kiełkowały 7 letnie nasiona z populacji torowej Wal-St (2008). Wykazano, że nasiona pochodzące od roślin z populacji torowych zachowują dłużej zdolność do kiełkowania (o kilka lat) niż nasiona pochodzące od roślin z lasów. Im krótszy czas między zebraniem nasion a ich wysianiem, tym nasiona słabiej kiełkowały. Oznacza to, że nasiona wymagają kilkumiesięcznego okresu spoczynku.

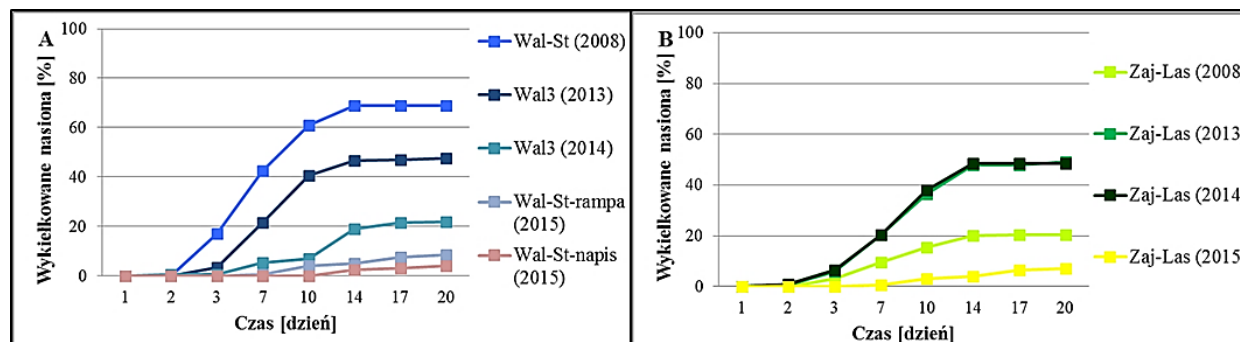


FIGURA 45. Dynamika kiełkowania nasion z populacji torowych: Wal-St (2008) – nasiona 7 letnie, Wal3 (2013) – nasiona 2 letnie, Wal3 (2014) – nasiona roczne, Wal-St-rampa (2015) i Wal-St-napis (2015) – nasiona 2 miesięczne (A), oraz leśnych: Zaj-Las (2008) – nasiona 7 letnie, Zaj-Las (2013) – nasiona 2 letnie, Zaj-Las (2014) – nasiona roczne i Zaj-Las (2015) – nasiona 2 miesięczne (B), w kolejnych dniach trwania testu.

POKRÓJ OGÓLNY ROŚLIN

Spośród wszystkich badanych populacji najbardziej wyróżniały się rośliny *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008). Były one niższe w porównaniu do roślin z pozostałych populacji z Walił i Zajezierec, a ich rozety miały mniejszą rozpiętość (Tablica XI). Rośliny z tej populacji wyróżniał także ciemnozielony kolor brzusznej strony blaszek liściowych oraz ciemnoróżowy kolor grzbietowej strony. Blaszki liściowe roślin z populacji Wal-St (2008) były mniejsze i mocniej powcinane w porównaniu do roślin z innych populacji (Tablica XII).

LICZBA LIŚCI

Po 3 miesiącach hodowli liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych była największa w populacji Wal-St (2008) i wynosiła około 24 liści. Natomiast najmniej liści (~14) miały rośliny z populacji Wal-St-rampa (2015). Rośliny z pozostałych populacji z Walił miały średnio między 15 a 22 liści w rozecie. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi, w których rośliny miały najwięcej liści w rozetach a populacjami, w których rośliny miały najmniej liści (FIG. 46A). W przypadku populacji leśnych z Zajezierec, po 3 miesiącach najwięcej liści w rozecie miały rośliny *G. robertianum* z populacji Zaj-Las (2013) – ~20 liści, a najmniej (~15) z populacji Zaj-Las (2014). Rośliny z pozostałych populacji z Zajezierec miały średnio około 16 liści w rozetach. Rośliny z populacji Zaj-Las (2013) różniły się istotnie liczbą liści od roślin z populacji Zaj-Las (2014) i (2015) (FIG. 46B). Po 3 miesiącach

liczba liści w rozetach roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 20 liści (FIG. 46A), zaś z populacji leśnych ~17 liści (FIG. 46B). Pomędzy całością populacji torowych i leśnych, po 3 miesiącach, stwierdzono różnice istotne statystycznie.

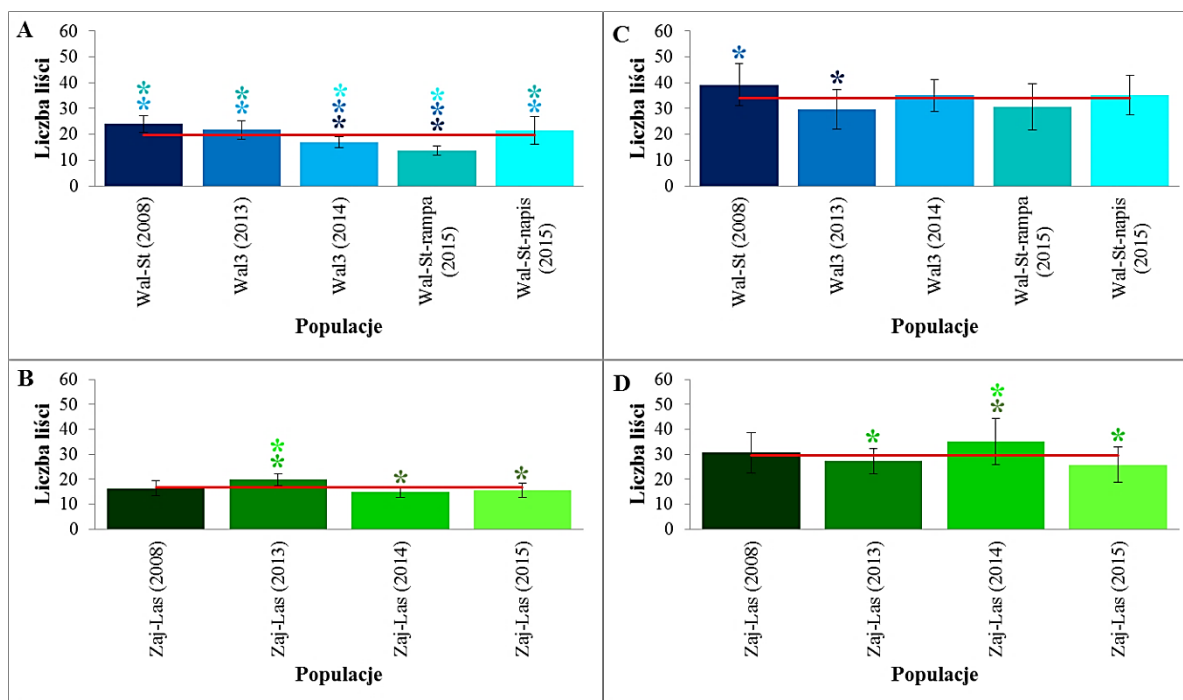


FIGURA 46. Liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A, C) i leśnych (B, D) w wieku 3 miesięcy (A, B) i 6 miesięcy (C, D). Czerwonymi liniami zaznaczono średnią liczbę liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. Do badań brano 29-30 osobników z danej populacji – pomiar I: osobniki z populacji torowych n=150 i leśnych n=120, pomiar II: osobniki z populacji torowych n=150 i leśnych n=119. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

Po 6 miesiącach liczba liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych była największa w populacji Wal-St (2008) i wynosiła około 39 liści. Najmniej liści (~30) miały rośliny z populacji Wal3 (2013) i Wal-St-rampa (2015). Rośliny z pozostałych populacji miały około 35 liści w rozecie. Zaobserwowane różnice były istotne statystycznie u roślin z populacji Wal-St (2008) i Wal3 (2013) (FIG. 46C). Po 6 miesiącach najwięcej liści w rozecie miały rośliny z populacji Zaj-Las (2014) – średnio 35 liści, a najmniej (~26) z populacji Zaj-Las (2015). Rośliny z pozostałych populacji z Zajezierec miały odpowiednio po około 30 liści w rozetach. Rośliny z populacji Zaj-Las (2014) różniły się istotnie liczbą liści od roślin z populacji Zaj-Las (2013) i (2015) (FIG. 46D). Po 6 miesiącach liczba liści w rozetach roślin ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 34 liści (FIG. 46C), zaś w przypadku populacji leśnych – około 30 liści (FIG. 46D). Obserwowane po 6 miesiącach hodowli różnice w liczbie liści w rozetach roślin *G. robertianum* pomiędzy całością populacji torowych i leśnych były istotne statystycznie.

DLUGOŚĆ OGONKÓW LIŚCIOWYCH

Po 3 miesiącach hodowli, w obrębie populacji torowych najdłuższe ogonki liściowe miały rośliny z populacji Wal-St (2008) i Wal3 (2013) (około 17 cm), a najkrótsze (~11 cm) z populacji

Wal-St-rampa (2015). W pozostałych populacjach z Wali, rośliny miały ogonki liściowe o długości około 15 cm. Zaobserwowano różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami z roślinami o najdłuższych i najkrótszych ogonkach liściowych (FIG. 47A). Rośliny z populacji leśnych po 3 miesiącach hodowli miały najdłuższe ogonki liściowe w populacji Zaj-Las (2013) około 18,5 cm. W pozostałych populacjach długość ogonków liściowych u roślin wynosiła około 16-17 cm. Różnice pomiędzy populacją Zaj-Las (2013) a populacjami Zaj-Las (2008) i (2014) były istotne (FIG. 47B). Po 3 miesiącach długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 15 cm (FIG. 47A), zaś u roślin ze wszystkich populacji leśnych – około 16,5 cm (FIG. 47B). Różnice w długości ogonków liściowych pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych były istotne statystycznie.

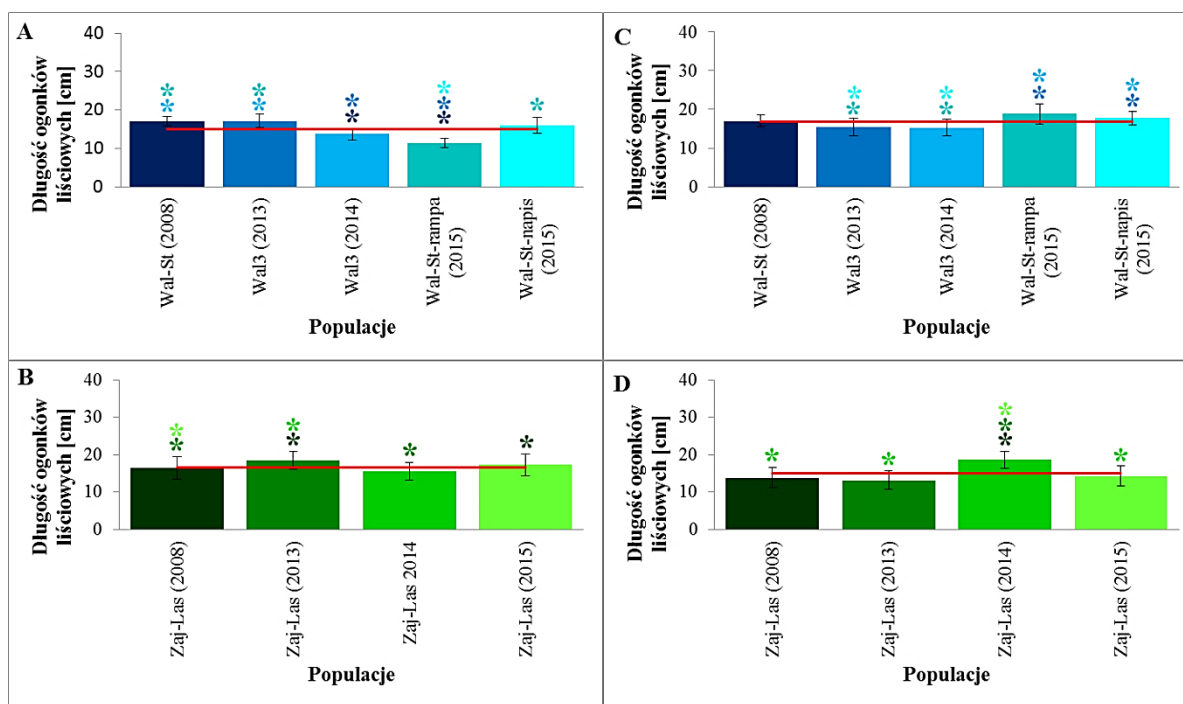


FIGURA 47. Długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A, C) i leśnych (B, D) w wieku 3 miesięcy (A, B) i 6 miesięcy (C, D). Czerwonymi liniami zaznaczono średnią liczbę liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. Do badań brano 29-30 osobników z danej populacji – pomiar I: osobniki z populacji torowych $n=150$ (n liści=750) i leśnych $n=120$ (n liści=600), pomiar II: osobniki z populacji torowych $n=150$ (n liści=1500) i leśnych $n=119$ (n liści=1190). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

Po 6 miesiącach w obrębie populacji torowych najdłuższe ogonki liściowe miały rośliny z populacji Wal-St-rampa (2015) – około 19 cm, a najkrótsze (~15 cm) rośliny z populacji Wal3 (2014) i Wal3 (2013). Rośliny z populacji Wal-St (2008) i Wal-St-napis (2015) miały ogonki liściowe długości około 17 i 18 cm. Tylko różnice pomiędzy populacjami Wal-St-rampa (2015) i Wal-St-napis (2015) a populacjami Wal3 (2014) i Wal3 (2013) były istotne (FIG. 47C). Po 6 miesiącach najdłuższe ogonki liściowe miały rośliny w populacji Zaj-Las (2014) około 18,62 cm. W pozostałych populacjach z Zajezierec długość ogonków liściowych u roślin wynosiła około 13-14 cm (uzyskany wynik był niższy niż po 3 miesiącach, ponieważ część najstarszych liści uschła). Różnice pomiędzy populacją Zaj-Las (2014) a pozostałymi populacjami z Zajezierec były

istotne (FIG. 47D). Po 6 miesiącach długość ogonków liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych wyniosła około 17 cm (FIG. 47C), zaś u roślin ze wszystkich populacji leśnych około 15 cm (FIG. 47D). Zaobserwowane różnice w długości ogonków liściowych pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych były istotne statystycznie.

WYSOKOŚĆ ROŚLIN

W przypadku populacji torowych po 3 miesiącach hodowli najwyższe były rośliny z populacji Wal-St-napis (2015) (ponad 16 cm), a najniższe z populacjach Wal-St (2008) i Wal-St-rampa (2015) – 11,85 cm i 11,91 cm. Rośliny z populacji Wal3 (2013) i Wal3 (2014) osiągały wysokość około 13-14 cm. Wyniki uzyskane dla roślin *G. robertianum* z populacji Wal-St (2008) i Wal-St-rampa (2015) były istotnie różne od tych uzyskanych dla roślin z populacji Wal-St-napis (2015) i Wal3 (2013) (FIG. 48A). W populacjach leśnych, po 3 miesiącach najwyższe były rośliny w populacjach Zaj-Las (2013) i (2014) – 17,79 cm i 13,60 cm, a najniższe w populacjach Zaj-Las (2008) i (2015) – 8,05 cm i 9,85 cm. Wyniki uzyskane dla roślin z populacji Zaj-Las (2013) i (2014) były istotnie różne od wyników uzyskanych dla pozostałych populacji leśnych oraz istotnie różne między sobą (FIG. 48B). Po 3 miesiącach hodowli wysokość roślin *G. robertianum* z populacji torowych wyniosła 13,48 cm (FIG. 48A), a u roślin z populacji leśnych 12,36 cm (FIG. 48B). Różnice w wysokości roślin pomiędzy całością populacji torowych i leśnych były nieistotne statystycznie.

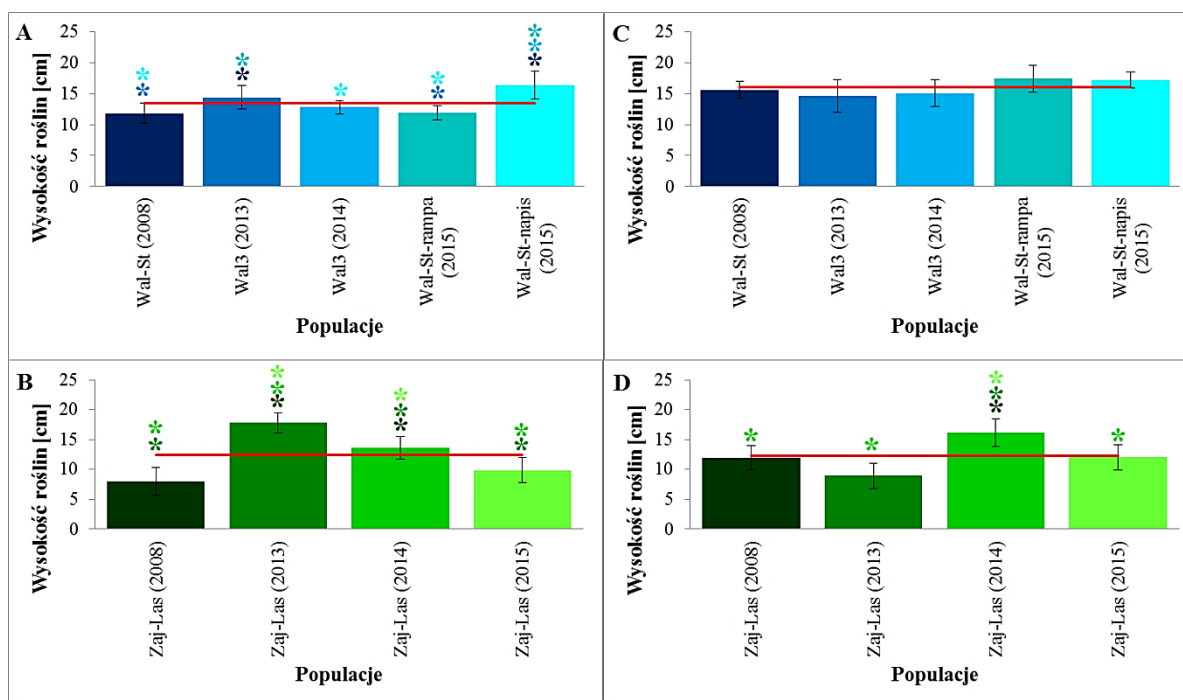


FIGURA 48. Wysokość roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A, C) i leśnych (B, D) w wieku 3 miesięcy (A, B) i 6 miesięcy (C, D). Czerwonymi liniami zaznaczono średnią liczbę liści u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. Do badań brano 29-30 osobników z danej populacji – pomiar I: osobniki z populacji torowych n=150 i leśnych n=120, pomiar II: osobniki z populacji torowych n=150 i leśnych n=119. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

Po 6 miesiącach najwyższe były rośliny z populacji Wal-St-rampa (2015) i Wal-St-napis (2015) – miały one około 17 cm. Rośliny z pozostałych populacji z Walł osiągały wysokość około 15 cm. Obserwowane różnice były nieistotne (FIG. 48C). Po 6 miesiącach, największą wysokość osiągały rośliny w populacji Zaj-Las (2014) (~16 cm), a najniższą w populacji Zaj-Las (2013) (~9 cm) (uzyskany wynik był niższy niż po 3 miesiącach, ponieważ część najstarszych liści uschła). Rośliny z populacji Zaj-Las (2008) i (2015) osiągały wysokość około 12 cm. Wyniki uzyskane dla roślin z populacji Zaj-Las (2014) były istotnie różne od wyników uzyskanych dla pozostałych populacji leśnych (FIG. 48D). Po 6 miesiącach hodowli wysokość roślin *G. robertianum* z populacji torowych wyniosła 16,00 cm (FIG. 48C), a u roślin z populacji leśnych 12,25 cm (FIG. 48D). Zaobserwowane różnice wysokości roślin pomiędzy całością populacji torowych i leśnych były istotne statystycznie.

ANALIZA PCA – LICZBA LIŚCI, DŁUGOŚĆ OGONKÓW LIŚCIOWYCH I WYSOKOŚĆ ROŚLIN

Dla opisywanych wyżej parametrów biometrycznych (zmienne: liczba liści, długość ogonków liściowych oraz wysokość roślin) zmierzonych po około 3 miesiącach hodowli roślin *G. robertianum* wykonano analizę składowych głównych (PCA). Jednak w przestrzeni dwóch głównych składowych nie nastąpiło po 3 miesiącach hodowli rozdzielanie roślin *G. robertianum* na jednolite grupy w oparciu o analizowane zmienne, ani ze względu na typ populacji – torowe lub leśne, ani ze względu na rok zbioru nasion. Jedynie populacje torowe Wal-St (2008) i Wal-St-rampa (2015) odstawały nieco od reszty populacji torowych i leśnych.

Także po około 6 miesiącach hodowli roślin *G. robertianum* wykonano analizę składowych głównych (PCA). Wyznaczono wartości własne macierzy korelacji. Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za ponad 81% informacji zawartych w zmiennych wejściowych a druga za ~16% informacji (TAB. 7). Najmocniej były skorelowane dane uzyskane z pomiarów „długości ogonków liściowych” i „wysokości roślin”. Większość informacji zawartych w badanych zmiennych była przenoszona przez główne składowe.

TABELA 7. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o liczbie liści oraz długości ogonków liściowych dziesięciu największych liści u roślin *G. robertianum* z populacji badawczych, po około 6 miesiącach hodowli. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	2,448822	81,62740	2,448822	81,6274
2	0,474469	15,81563	2,923291	97,4430
3	0,076709	2,55697	3,000000	100,000

Na FIGURZE 49 przedstawiono wyniki analizy PCA w oparciu o wyniki badań biometrycznych, dla roślin *G. robertianum* po 6 miesiącach hodowli. Za położenie punktów w przestrzeni PC1 odpowiadała w największym stopniu zmienna „wysokość roślin” i „długość ogonków liściowych”, zaś w przestrzeni PC2 – zmienna „liczba liści” i „długość ogonków liściowych”. W przestrzeni dwóch głównych składowych nie nastąpiło dokładne rozdzielanie

roślin na jednolite grupy w oparciu o analizowane zmienne (ani ze względu na typ populacji – torowe lub leśne, ani ze względu na rok zbioru nasion). Rośliny *G. robertianum* z populacji Zaj-Las (2014) były bardziej zbliżone pod względem wyglądu do roślin z populacji torowych. Rośliny z populacji Wal3 (2013) były bardziej zbliżone do populacji leśnych.

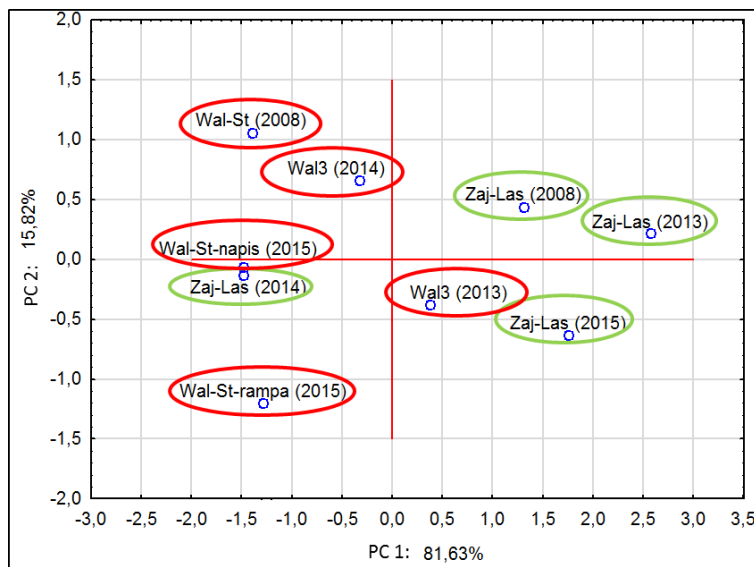


FIGURA 49. Analiza składowych głównych (PCA) przeprowadzona na macierzy zawierającej dane o liczbie liści i długości ogonków liściowych dziesięciu największych liści roślin *G. robertianum* z populacji badawczych (po około 6 miesiącach hodowli). Wykres przedstawia położenie punktów odpowiadających analizowanym przypadkom w przestrzeni pierwszej (PC1) i drugiej (PC2) głównej składowej, wyjaśniających odpowiednio 81,63% i 15,82% ogólnej wariancji. Na czerwono oznaczono populacje torowe, a na zielono populacje leśne.

WIELKOŚĆ LIŚCI

W przypadku populacji torowych największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji Wal-St-rampa (2015), a najmniejsze z populacji Wal-St (2008). Rośliny z populacji torowej Wal-St (2008) miały istotnie mniejsze blaszki liściowe niż rośliny z pozostałych populacji torowych i leśnych (FIG. 50-53). W przypadku populacji leśnych największe blaszki liściowe miały rośliny z populacji Zaj-Las (2014), a najmniejsze z populacji Zaj-Las (2013). Istotnie mniejsze blaszki liściowe miały rośliny z populacji Zaj-Las (2013) w porównaniu do roślin z pozostałych populacji leśnych i torowych (FIG. 50-53).

Wymiary blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji leśnych w stosunku do roślin z populacji torowych, wyhodowanych z nasion zebranych w latach 2013-2015, były dość zbliżone. Różnice w wielkości blaszek liściowych pomiędzy populacjami torowymi, a leśnymi były częściowo istotne statystycznie (FIG. 54). Wykazano natomiast, że blaszki liściowe roślin z populacji torowej Wal-St (2008) są istotnie mniejsze zarówno w porównaniu do blaszek liściowych roślin z populacji leśnych, jak i roślin z innych populacji torowych.

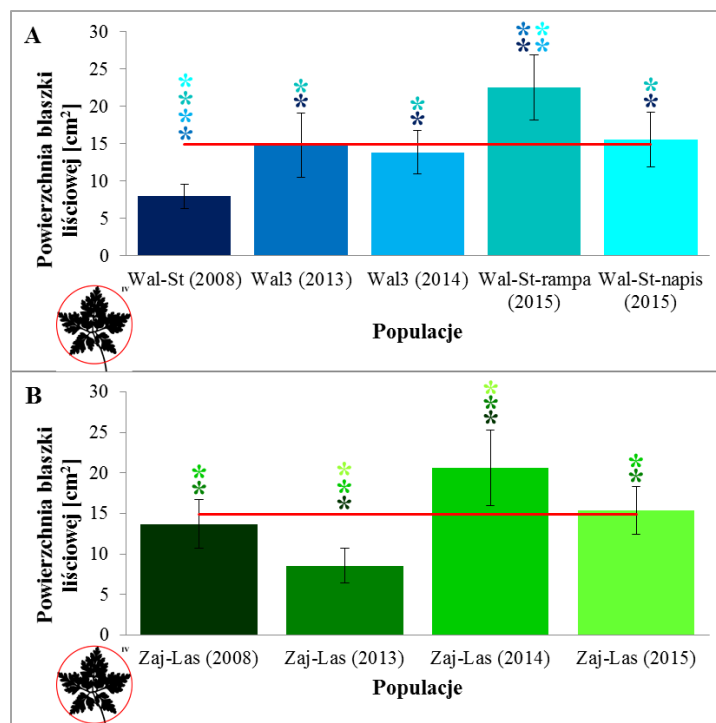


FIGURA 50. Powierzchnia blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

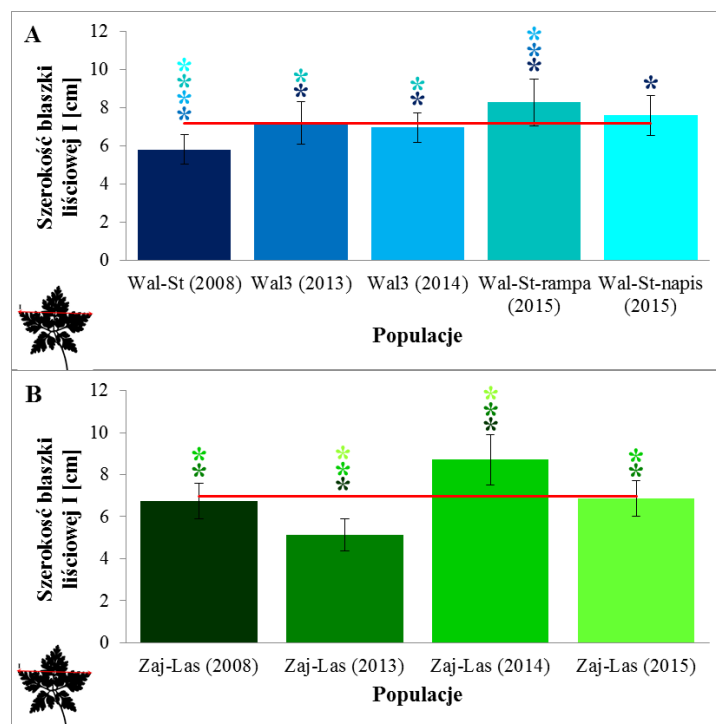


FIGURA 51. Szerokość I (górna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

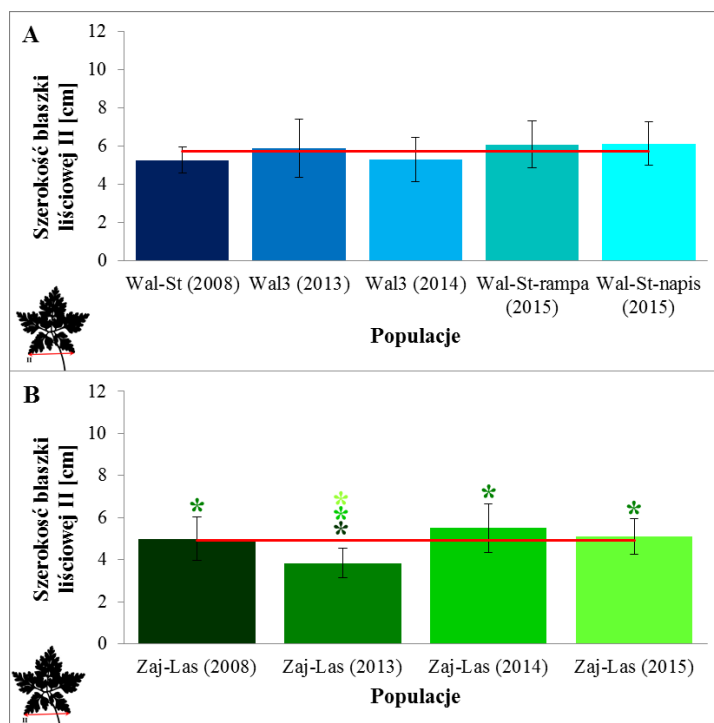


FIGURA 52. Szerokość II (dolna) blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i łącznie leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

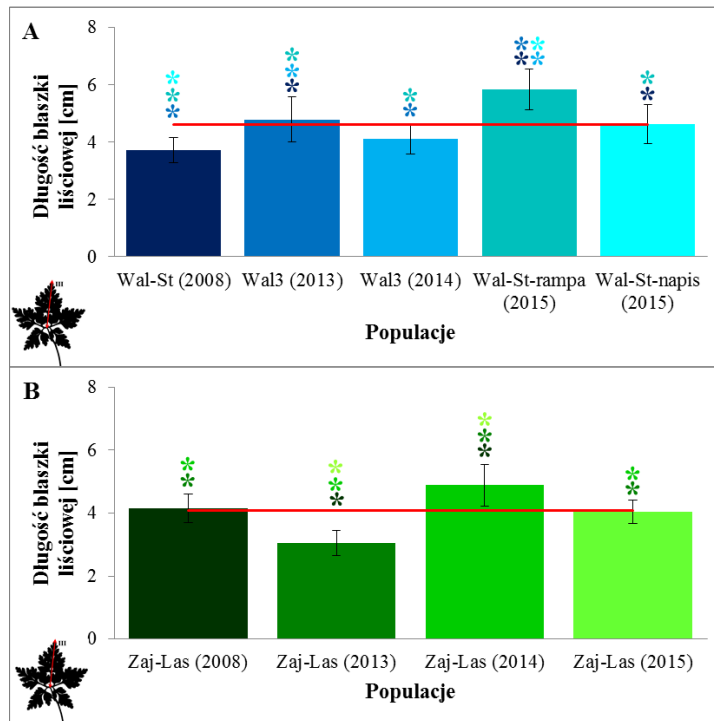


FIGURA 53. Długość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z poszczególnych populacji torowych (A) i leśnych (B), w wieku 6-6,5 miesiąca. Czerwonymi liniami zaznaczono średnie dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych (A) i łącznie leśnych (B). Do badań brano po 5 liści z dziesięciu roślin z danej populacji (n=50). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy poszczególnymi populacjami (test Kruskala-Wallisa; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

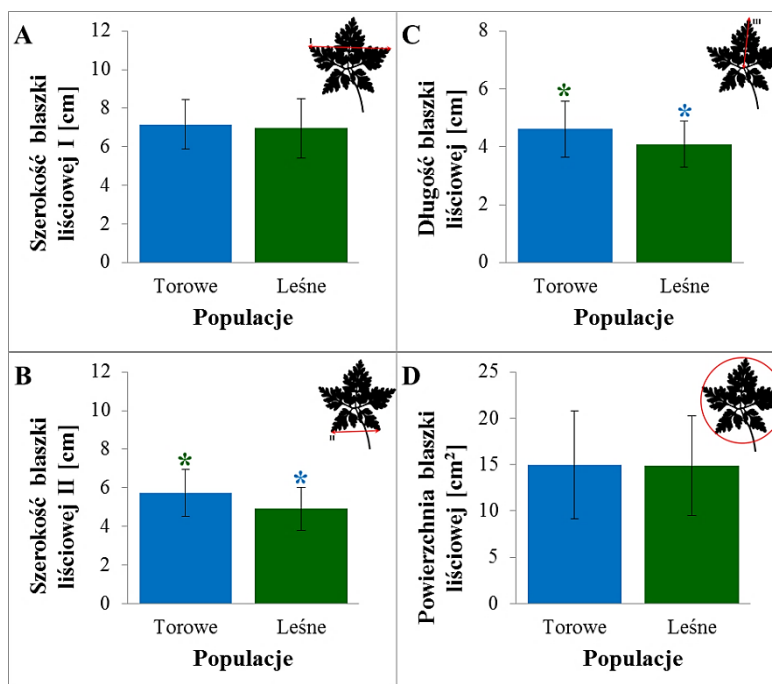


FIGURA 54. Wielkość blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* ze wszystkich populacji torowych i leśnych, w wieku 6-6,5 miesiąca: szerokość I – górna (A) i II – dolna (B), długość (C), powierzchnia (D). Do badań wzięto 250 liści roślin z populacji torowych (n=250) i 200 liści z roślin z populacji leśnych (n=200). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

ANALIZA PCA – WIELKOŚĆ LIŚCI

Dla opisywanych wyżej parametrów biometrycznych wykonano analizę składowych głównych (PCA). Zmiennymi były szerokość blaszek liściowych zmierzona w dwóch miejscach, długość oraz powierzchnia blaszek liściowych roślin *G. robertianum*. Wyznaczono wartości własne macierzy korelacji. Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za prawie 88% informacji zawartych w zmiennych wejściowych a druga za ponad 9% informacji (TAB. 8).

Wszystkie zmienne były ze sobą silnie skorelowane, jednak najmocniej – dane uzyskane z pomiarów „powierzchni” i „szerokości I” blaszek liściowych roślin *G. robertianum*. Większość informacji zawartych w badanych zmiennych była przenoszona przez główne składowe. Za położenie punktów w przestrzeni PC1 odpowiadała w największym stopniu zmienna „długość” i „szerokość I” blaszek liściowych. Natomiast za położenie punktów w przestrzeni PC2 odpowiadała głównie zmienna „szerokość II” i „powierzchnia” blaszek liściowych. W przestrzeni dwóch głównych składowych nie nastąpiło dokładne rozdzielenie roślin na jednolite grupy w oparciu o analizowane zmienne (ani ze względu na typ populacji – torowe lub leśne, ani ze względu na rok zbioru nasion). Rośliny *G. robertianum* z populacji leśnych Zaj-Las (2014) i Zaj-Las (2013) oraz populacji torowych Wal-St (2008) i Wal-St-rampa (2015) odstawały nieco od roślin z pozostałych populacji torowych i leśnych (FIG. 55).

TABELA 8. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o szerokości blaszek liściowych zmierzonej w dwóch punktach, długości oraz powierzchni blaszek liściowych u roślin *G. robertianum* z populacji badawczych, po około 6 miesiącach hodowli. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	3,514415	87,86038	3,514415	87,8604
2	0,387620	9,69051	3,902036	97,5509
3	0,086970	2,17425	3,989006	99,7251
4	0,010994	0,27486	4,000000	100,0000

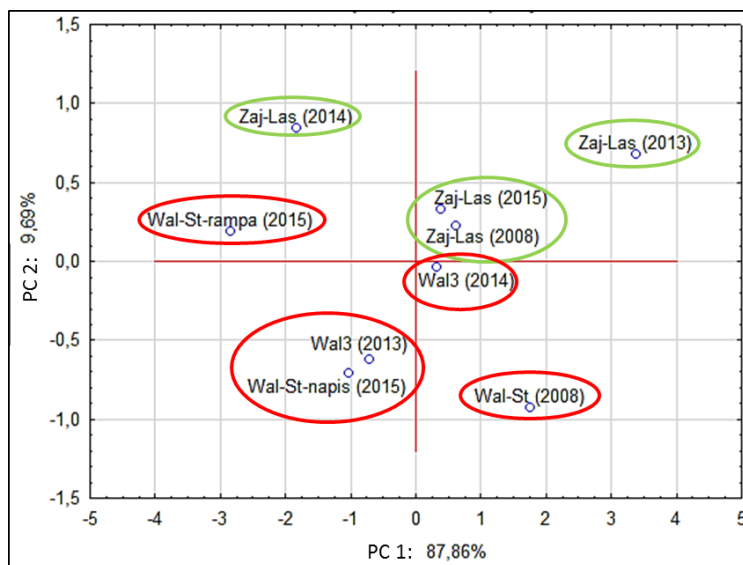


FIGURA 55. Analiza składowych głównych (PCA) przeprowadzona na macierzy zawierającej dane o szerokości blaszek liściowych zmierzonej w dwóch punktach, długości oraz powierzchni blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z populacji badawczych (po około 6 miesiącach hodowli). Wykres przedstawia położenie punktów odpowiadających analizowanym przypadkom w przestrzeni pierwszej (PC1) i drugiej (PC2) głównej składowej, wyjaśniających odpowiednio 81,63% i 15,82% ogólnej wariancji. Na czerwono oznaczono populację torowe, a na zielono populacje leśne.

KOLOR BLASZEK LIŚCIOWYCH

Po 3 i 6 miesiącach hodowli, rośliny *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) miały stronę brzusznią blaszek liściowych mocno ciemnozieloną, zaś stronę grzbietową ciemnoróżową. Po 6 miesiącach liście roślin z populacji Wal-St (2008) były nieco jaśniejsze w porównaniu do liści obserwowanych po 3 miesiącach hodowli (FIG. 56A, C). Przez cały okres hodowli rośliny z populacji leśnej Zaj-Las (2008) charakteryzowała duża różnorodność koloru blaszek liściowych, różna w zależności od wieku obserwowanych liści. Strona brzuszna najmłodszych liści miała kolor od jasno- do ciemnozielonego, natomiast liście ze środkowych okółków i najstarsze miały kolor od średnio- do ciemnozielonego. Strona grzbietowa wszystkich liści u roślin z populacji Zaj-Las (2008) była najczęściej jasnozielona, często także obserwowano lekko różowe zabarwienie blaszek liściowych na najmłodszych liściach (FIG. 56B, D).

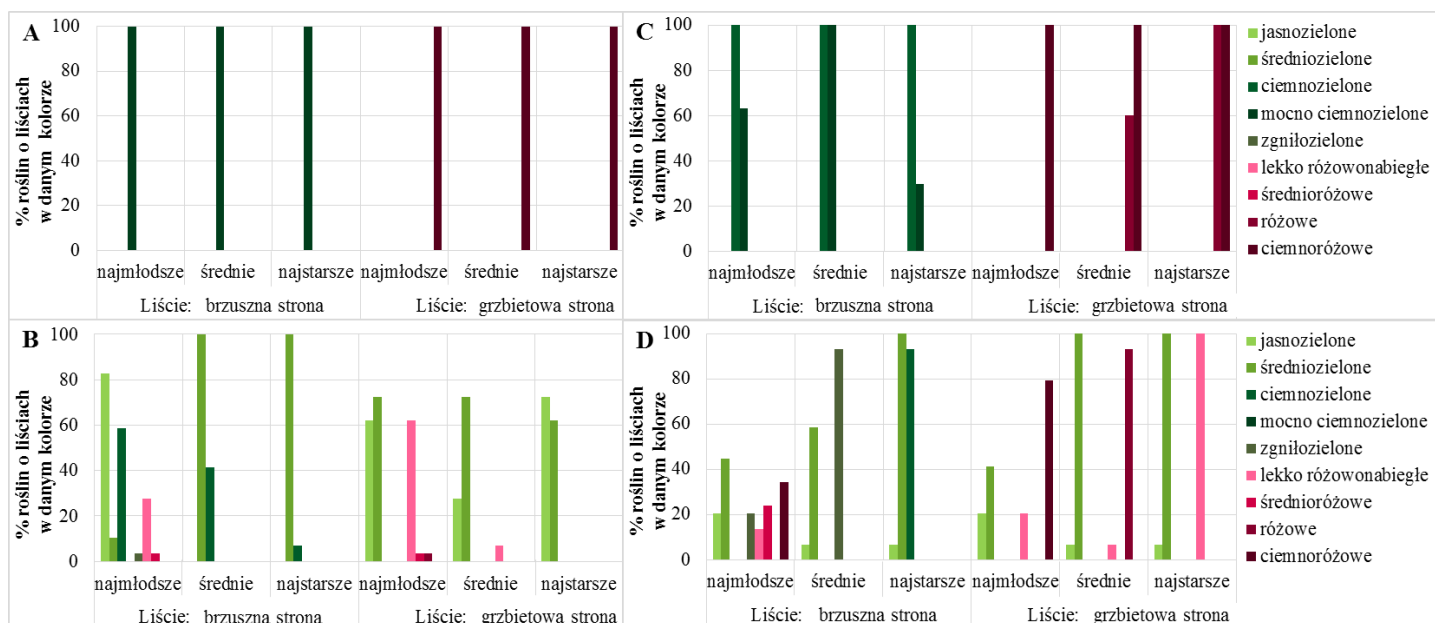


FIGURA 56. Liczba roślin [%] *G. robertianum* o liściach w danym kolorze, z populacji torowej Wal-St (2008) (A, C) i leśnej Zaj-Las (2008) (B, D). Oceniano kolor brzusznej i grzbietowej strony blaszek liściowych, oddzielnie u liści najmłodszych, w średnim wieku (środkowe okółki rozet) oraz liści najstarszych. Wiek roślin 3-3,5 miesiąca (A, B) oraz 6-6,5 miesiąca (C, D). Do badań użyto, pomiar I i II: osobniki z populacji torowej n=30 i leśnej n=30 (pomiar I) oraz n=29 (pomiar II).

Różnice w kolorze liści pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych, których nasiona zebrano w 2013 i 2014 roku, nie były duże. Strona brzuszna blaszek liściowych u roślin z tych populacji miała kolor od jasno- do ciemnozielonego – liście najmłodsze były najjaśniejsze a najstarsze najciemniejsze. Podobnie wyglądała strona grzbietowa ich blaszek liściowych, przy czym dodatkowo obserwowano liście o lekko- lub średnio różowym zabarwieniu.

Kolor liści roślin z populacji Wal-St-rampa (2015) był w porównaniu do innych populacji z Walii najbardziej podobny do koloru liści roślin z populacji Wal-St (2008), jednak nie był on tak ciemny. Również liście roślin z populacji Wal-St-napis (2015) od strony brzusznej były najczęściej ciemnozielone lub mocno ciemnozielone, zaś od strony grzbietowej różowe lub ciemnoróżowe, jednak nie aż tak ciemne, jak u roślin z populacji Wal-St (2008) (FIG. 57A, B). Liście roślin z populacji Zaj-las (2015) były zarówno od strony brzusznej, jak i od strony grzbietowej podobne do liści roślin z pozostałych populacji leśnych z Zajezierec (FIG. 57C, F).

Podsumowując, populacja torowa Wal-St (2008) pod kątem koloru blaszek liściowych różniła się istotnie w stosunku do innych populacji torowych i leśnych. Ponieważ ocena wizualna koloru blaszek liściowych pozwoliła w pewnym stopniu podzielić rośliny *G. robertianum* na populacje torowe i leśne wykonano pomiar zawartości antocyjanów w liściach roślin z badanych populacji.

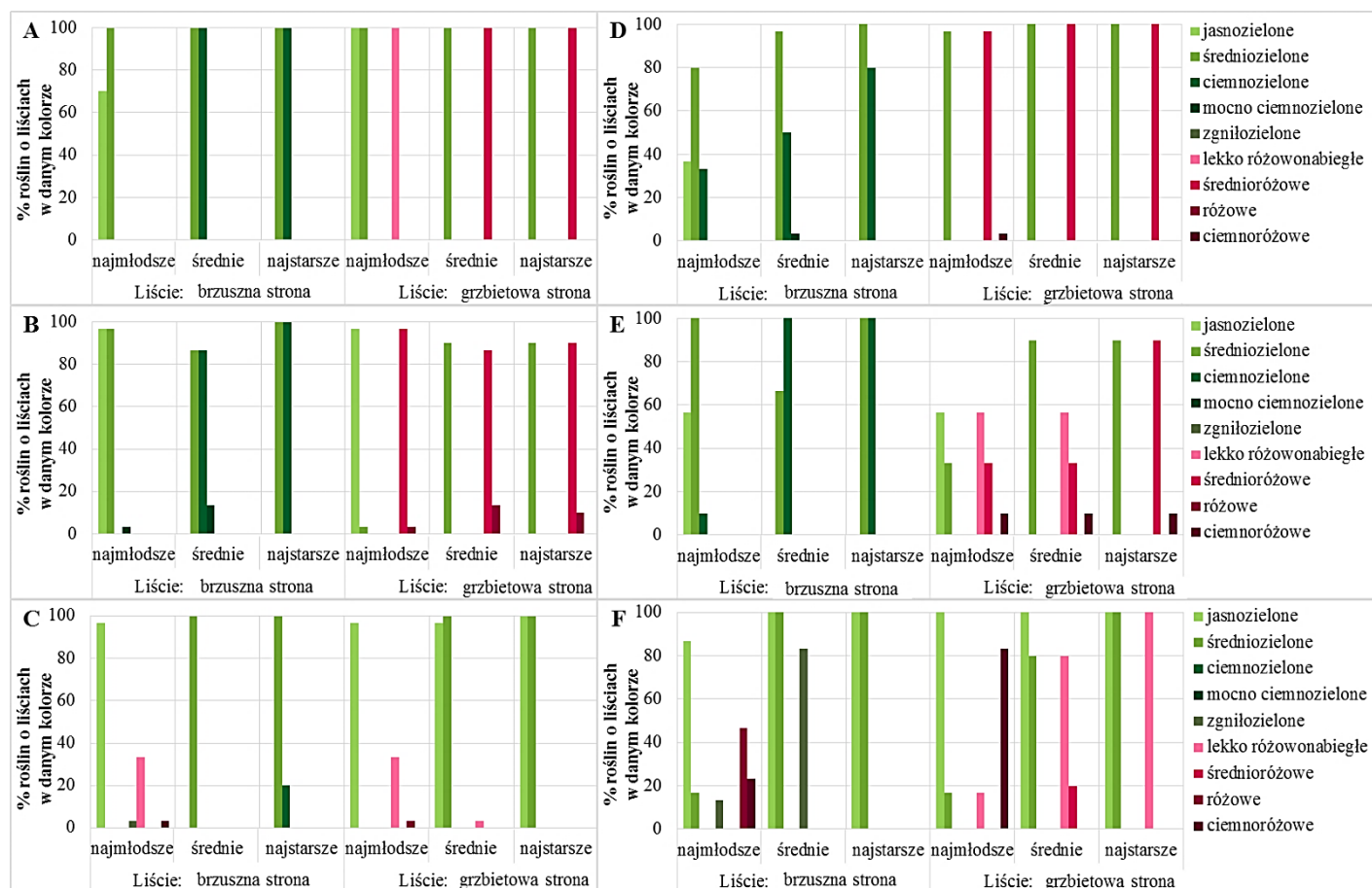


FIGURA 57. Liczba roślin [%] *G. robertianum* o liściach w danym kolorze, z populacji torowych Wal-St-rampa (2015) (A, D), Wal-St-napis (2015) (B, E) i leśnej Zaj-Las (2015) (C, F). Oceniano kolor brzuszej i grzbietowej strony blaszek liściowych, oddzielnie u liści najmłodszych, w średnim wieku (środkowe okółki rozet) oraz liści najstarszych. Wiek roślin 3-3,5 miesiąca (A-C) oraz 6-6,5 miesiąca (D-F). Do badań użyto, pomiar I i II: osobniki z danej populacji torowej n=30 i leśnej n=30.

ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW

Sprawdzono zawartość antocyjanów w liściach (blaszkach i ogonkach liściowych) roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Walił-Stacji i populacji leśnych z Zajezierec, wyhodowanych z nasion zebranych w różnych latach. Dla przykładu, na TABLICY XIII przedstawiono wygląd grzbietowej i brzuszej powierzchni blaszek liściowych, wygląd ogonków liściowych oraz przekroje przez blaszki i ogonki liściowe roślin z populacji Wal-St (2008) i Zaj-Las (2014). Zarówno blaszki liściowe, jak i ogonki liściowe były intensywniej wybarwione na różowo w populacji torowej z Walił niż w populacji leśnej z Zajezierec. Natomiast na przekrojach blaszki liściowej było widać, że antocyjany w przypadku rośliny z populacji Wal-St (2008) lokalizowały się w epidermie, czego nie obserwowano w blaszce liściowej rośliny z populacji Zaj-Las (2014). W przypadku przekroju przez ogonek liściowy u rośliny z populacji Wal-St (2008) antocyjany lokalizowały się zarówno w epidermie, jak i w komórkach przy wiązkach przewodzących. Natomiast w przypadku rośliny z populacji Zaj-Las (2014) antocyjany zlokalizowane były w ogonku liściowym tylko w komórkach przy wiązce przewodzącej.

Zawartość antocyjanów w blaszkach liściowych była największa u roślin *G. robertianum* z populacji torowych Wal-St (2008) i Wal-St-rampa (2015). Natomiast zawartość antocyjanów w blaszkach liściowych roślin z pozostałych populacji torowych z Walił była zbliżona do poziomu obserwowanego w blaszkach liściowych roślin z populacji leśnych z Zajezierec. Najmniej antocyjanów w blaszkach liściowych obserwowano w roślinach z populacji Zaj-Las (2015). Zaobserwowane różnice w zawartości antocyjanów w blaszkach liściowych roślin *G. robertianum* były istotne statystycznie pomiędzy populacją Wal-St (2008) i Zaj-Las (2015) oraz między populacją Wal-St-rampa (2015) i Zaj-Las (2015). Obserwowane różnice pomiędzy całością populacji torowych i całością populacji leśnych były istotne statystycznie (FIG. 58A).

Zawartość antocyjanów w ogonkach liściowych roślin *G. robertianum* we wszystkich populacjach torowych z Walił była około dwukrotnie większa niż w populacjach leśnych z Zajezierec. Najwyższy poziom antocyjanów w ogonkach liściowych obserwowano u roślin z populacji Wal-St (2008) a najmniejszy z populacji Zaj-Las (2014) i Zaj-Las (2015). Zaobserwowane różnice były istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi: Wal-St (2008), Wal-St-napis (2015) i Wal-St-rampa (2015) a wszystkimi populacjami leśnymi z Zajezierec. Obserwowane różnice pomiędzy całością populacji torowych i całością populacji leśnych były istotne statystycznie (FIG. 58B).

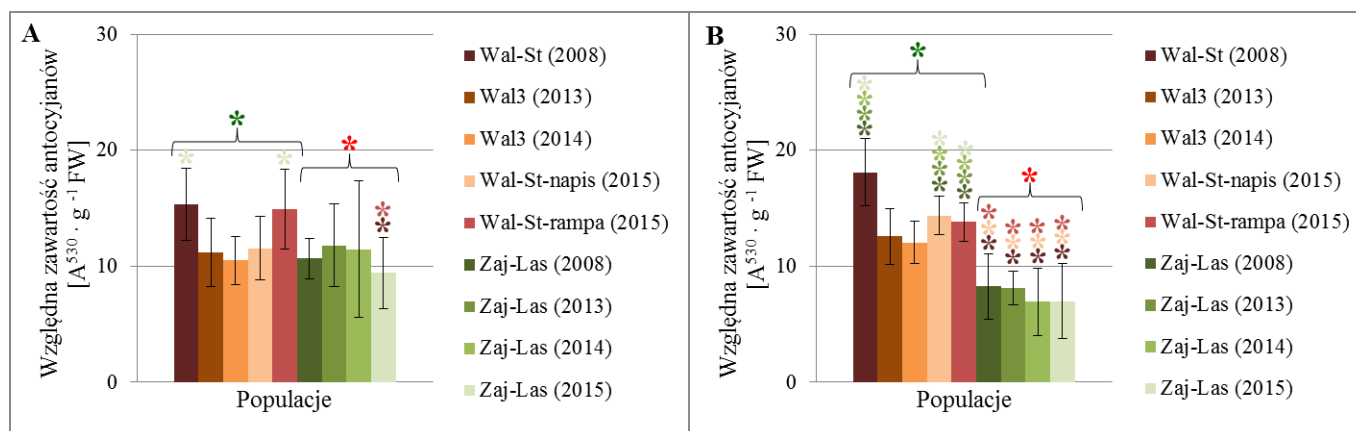


FIGURA 58. Względna zawartość antocyjanów [$A^{530} \cdot g^{-1} FW$] w blaszkach (A) i ogonkach liściowych (B) roślin *G. robertianum* z populacji torowych: Wal-St (2008), Wal3 (2013), Wal3 (2014), Wal-St-napis (2015), Wal-St-rampa (2015), oraz leśnych: Zaj-Las (2008), Zaj-las (2013), Zaj-Las (2014), Zaj-Las (2015). Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi; klamrą i gwiazdką oznaczono różnice istotne statystycznie dla danego typu populacji (torowe / leśne) (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,05$).

Wykonano analizę PCA pod kątem zawartości antocyjanów w liściach roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Walił oraz leśnych z Zajezierec. Zmiennymi były względna zawartość antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych. Wyznaczono wartości własne macierzy korelacji. Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za ponad 86% informacji zawartych w zmiennych wejściowych (TAB. 9).

Położenie punktów w przestrzeni PC1 i PC2 badane zmienne określały po równo. Na wykresie przedstawiającym populacje badawcze w przestrzeni dwóch głównych składowych widać, że populacje można podzielić na cztery grupy. Pierwszą grupę oznaczoną zielonym

okręgiem utworzyły rośliny z populacji leśnych z Zajeziere, których blaszki i ogonki liściowe zawierały mniej antocyjanów niż populacje torowe z Walil. Drugą grupę oznaczoną niebieskim okręgiem utworzyły rośliny z populacji torowych Wal3 (2013), Wal3 (2014) i Wal-St-napis (2015), które zarówno w blaszkach, jak i ogonkach liściowych charakteryzowała średnia zawartość antocyjanów. Ostatnie dwie grupy oznaczone na pomarańczowo i różowo utworzyły pojedyncze populacje torowe, odpowiednio – Wal-St-rampa (2015) i Wal-St (2008), które zawierały najwięcej antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych, przy czym rośliny z populacji Wal-St (2008) zawierały najwięcej antocyjanów (FIG. 59). Wyniki analizy PCA pozwoliły wyodrębnić rośliny z populacji Wal-St (2008), jako odrębną grupę – wyróżniającą się na tle innych populacji.

TABELA 9. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o względnej zawartości antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych roślin *G. robertianum* z populacji badawczych. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	1,723646	86,18229	1,723646	86,1823
2	0,276354	13,81771	2,000000	100,0000

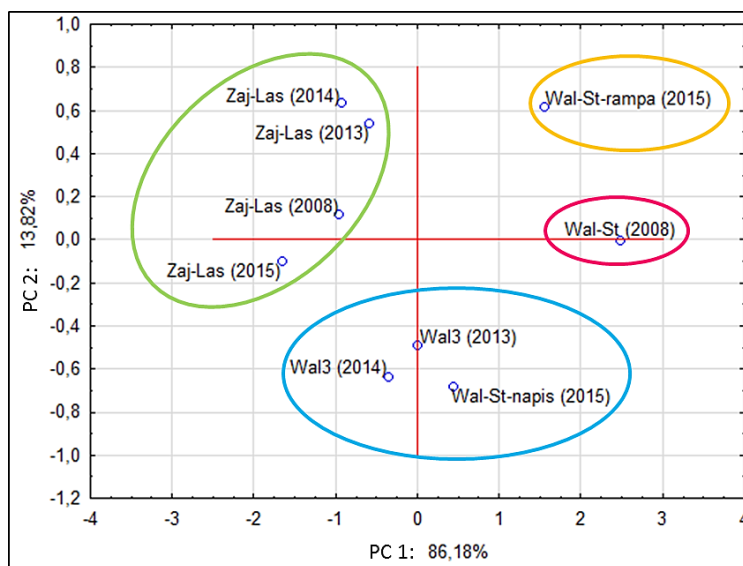


FIGURA 59. Analiza składowych głównych (PCA) przeprowadzona na macierzy zawierającej dane o względnej zawartości antocyjanów w blaszkach i ogonkach liściowych roślin *G. robertianum* z populacji badawczych. Wykres przedstawia położenie punktów odpowiadających analizowanym przypadkom w przestrzeni pierwszej (PC1) i drugiej (PC2) głównej składowej, wyjaśniających odpowiednio 86,18% i 13,82% ogólnej wariancji. Zielonym, niebieskim, żółtym i różowym okręgiem oznaczono wyodrębnione grupy populacji.

WPLYW SUSZY NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Jednym z czynników, który mógłby różnicować rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych jest występowanie na torach kolejowych niedoboru wody. Dlatego też sprawdzono dostosowanie roślin *G. robertianum* z populacji torowych: Wal-St (2008)

i Wal3 (2014), oraz leśnej Zaj-Las (2014), do warunków suszy. Wygląd roślin z poszczególnych populacji po 26 dniach suszy przedstawiono na TABLICY XIV.

Wykazano, że do warunków suszy lepiej dostosowane były rośliny z populacji torowych, w szczególności roślina z populacji Wal-St (2008), na której po 26 dniach suszy nadal obserwowano wyrastanie nowych liści. Również nasilenie innych zmian takich jak chlorozy, nekrozy, czy zaczerwienienie liści było najniższe na liściach rośliny z populacji Wal-St (2008). Z kolei, roślina z populacji leśnej Zaj-Las (2014) gorzej reagowała na warunki suszy niż rośliny z populacji torowych. Po 26 dniach suszy obserwowano całkowite zaschnięcie wszystkich liści u tej rośliny. Ponadto w trakcie trwania doświadczenia u rośliny z populacji leśnej obserwowano silniejsze w porównaniu do roślin z populacji torowych wystąpienie nekroz na liściach oraz większy procent zaczerwienionych blaszek liściowych w reakcji na suszę (FIG. 60).

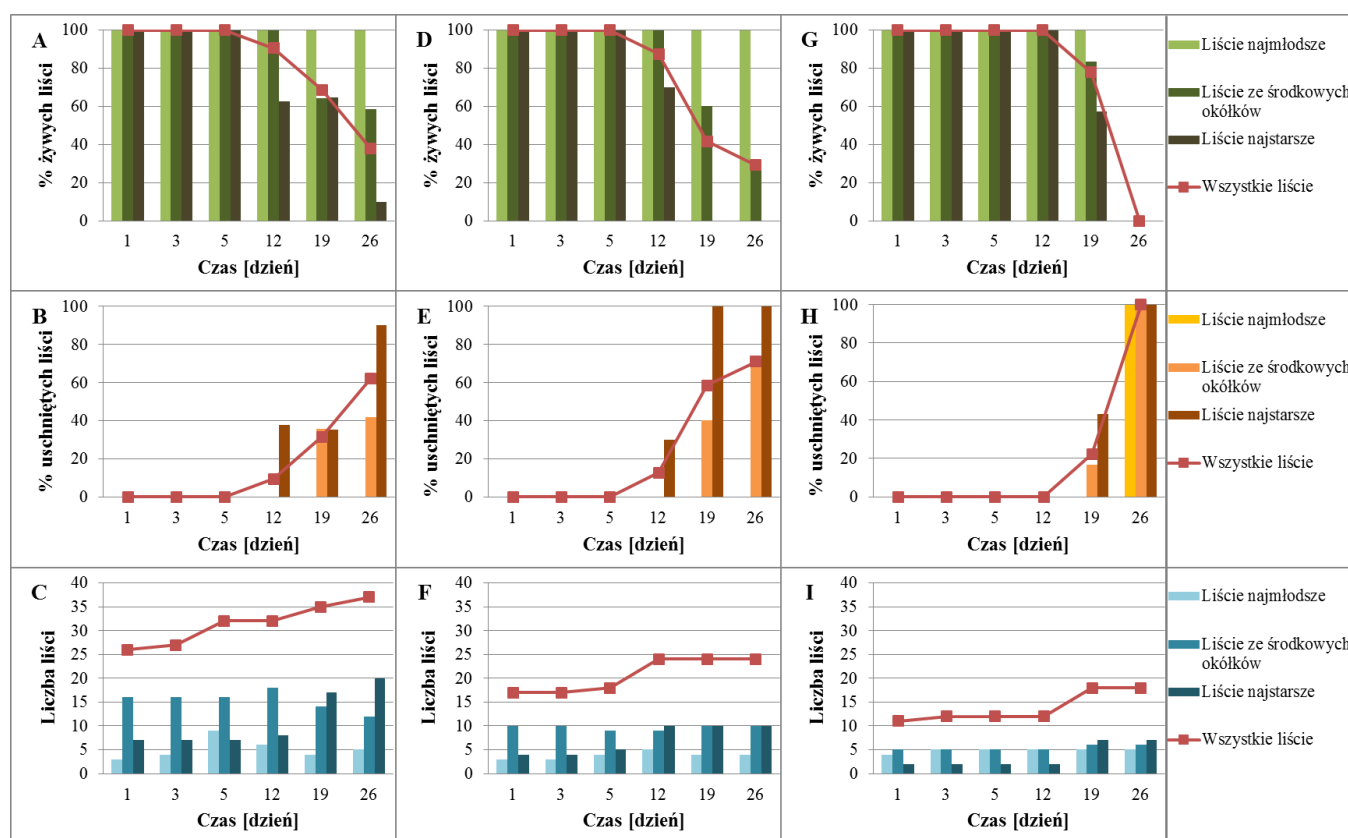


FIGURA 60. Procent liści żywych (A, D, G), uschniętych (B, E, H) oraz liczba liści (suma) (C, F, I) na roślinach z populacji torowych: Wal-St (2008) (A-C), Wal3 (2014) (D-F) lub populacji leśnej Zaj-Las (2014) (G-I), w kolejnych dniach trwania suszy. Podział liści: najmłodsze, ze środkowych okółków, najstarsze, wszystkie liście łącznie.

PODSUMOWANIE

Celem badań było porównanie zróżnicowania fenotypowego roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Wali i leśnych z Zajezierec, wyhodowanych z nasion zebranych w różnych latach. Wykazano, że populacja torowa z Wali wyhodowana z nasion z 2008 r. różni się istotnie od innych populacji torowych i leśnych. Poniżej przedstawiono najważniejsze wyniki:

- Populacja Wal-St (2008) wyróżniała się spośród innych populacji torowych i leśnych. Rośliny te były mniejsze, miały mniejsze i ciemniejsze liście, które zawierały więcej antocyjanów w porównaniu do roślin z innych populacji. Nasiona roślin z populacji Wal-St (2008) kiełkowały najszybciej spośród nasion roślin z innych populacji. Wykazano także, że roślina z populacji Wal-St (2008) była lepiej dostosowana do warunków suszy niż rośliny z innych populacji.
- Obserwowano niewielkie różnice pomiędzy populacjami torowymi z Walił i leśnymi z Zajezierec, wyhodowanymi z nasion zebranych w latach 2013-2015. Analizy PCA, nie w każdym przypadku pozwoliły na jednoznaczne wyróżnienie grupy populacji torowych i leśnych. Jedynie rośliny z populacji Wal-St (2008) wyróżniały się spośród innych populacji. Wykazano że, charakterystyczne cechy obserwowane u roślin z populacji Wal-St (2008) zanikły wraz z czasem.

W dalszym etapie badań podjęto próbę analizy możliwych przyczyn wyróżniania się torowej populacji z Walił-Stacji – Wal-St (2008), spośród pozostałych badanych populacji torowych i leśnych. Zbadano wpływ herbicydu Roundup na rośliny z populacji torowych i leśnych. Wykonano także badania sprawdzające biologię reprodukcji roślin *G. robertianum* oraz przeprowadzono badania genetyczne.

IV.5. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Opryski herbicydem mogły stanowić czynnik selekcyjny, który spowodował pojawienie się na torach w Waliłach-Stacji nowej formy *G. robertianum*. Celem badań opisanych w tym rozdziale było sprawdzenie wpływu herbicydu Roundup na rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych. W ramach badań starano się odpowiedzieć na pytanie, czy istnieją różnice w tolerancji na herbicyd Roundup pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych.

IV.5.1. BADANIA WSTĘPNE

Pierwszym celem badań wstępnych było ustalenie metodyki do dalszych badań, w tym dawki herbicydu Roundup pozwalającej obserwować stopniowe zmiany morfologiczne i ultrastrukturalne u roślin *G. robertianum*. Drugim celem było poznanie reakcji na herbicyd Roundup roślin występujących na torach kolejowych, aby móc we właściwych badaniach porównać reakcję na herbicyd pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych.

W trakcie pierwszego etapu badań wstępnych przetestowano siedem dawek oprysku herbicydem Roundup na roślinach z populacji torowej. Po około 2 tygodniach zaobserwowano chlorozę między żyłkową najmłodszych liści we wszystkich wariantach doświadczalnych poza kontrolą (TABLICA XV). Dalsze obserwacje wykazały stopniowy zanik chloroz w przypadku roślin po oprysku niższymi dawkami herbicydu. Po najwyższej dawce obserwowano całkowite zamarcie roślin. W ciągu miesiąca/dwóch od oprysku niższymi dawkami herbicydu 1/3 roślin zakwitła i wydała nasiona zdolne do kiełkowania. Natomiast, żadna z roślin kontrolnych nie zakwitła. W trakcie badań w TEM we wszystkich wariantach po oprysku herbicydem Roundup

obserwowano, m.in. elektronogęste złogi w różnych przedziałach komórkowych oraz dodatkowe przedziały błonowe w wakuolach. Zastosowane dawki herbicydu Roundup: 40 mg/l glifosatu po 5 / 20 / 40 ml roztworu na roślinę (200 / 800 / 1600 µg glifosatu), 60 mg/l glifosatu po 5 / 20 / 40 ml roztworu na roślinę (300 / 1200 / 2400 µg glifosatu) oraz 1700 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę (34 000 µg glifosatu), okazały się właściwe do prowadzenia obserwacji makroskopowych i w TEM. Także czasy utrwalania fragmentów liści po oprysku herbicydem: 12h, 32-34h i 58h, okazały się właściwe do prowadzenia obserwacji w TEM. Uzyskane wyniki stanowiły punkt wyjścia do dalszych badań.

Do drugiego etapu badań wstępnych wykorzystano rośliny *G. robertianum* z kilku populacji torowych. W ramach obserwacji makroskopowych wykazano, że najsilniejsze zmiany u roślin pojawiły się na liściach, które wyrosły po dwóch tygodniach od oprysku herbicydem Roundup (silne chlorozy, zmieniony kształt blaszki liściowej), a których nie było jeszcze na roślinach w dniu oprysku. Z czasem nastąpiła całkowita lub częściowa regeneracja tych blaszek liściowych (TABLICA XVI). Znaczny zanik chloroz był widoczny już po około 30-40 dniach od oprysku, zaś niemal całkowity zanik chloroz po 60-70 dniach. Młode liście wyrastały bez chloroz po około trzech tygodniach od oprysku. Liście te nie miały zmienionego kształtu blaszki liściowej. Obraz liści roślin *G. robertianum* w kontroli był zawsze prawidłowy.

W przypadku obserwacji w mikroskopie świetlnym (TABLICA XVII) liście roślin *G. robertianum*, które były dojrzałe oraz liście, które były najmłodsze na roślinie w dniu oprysku herbicydem, nie różniły się strukturą blaszki liściowej w stosunku do odpowiadającej im kontroli. Największe zmiany w strukturze liści roślin poddanych opryskowi herbicydem obserwowano u liści, które pojawiły się 2 tygodnie po oprysku. W komórkach tych liści m.in. występowało znacznie więcej „złogów” i charakterystycznych szarości, niż w kontroli. Z czasem jednak (po około 30 dniach) liście, które pojawiły się na roślinach 2 tygodnie po oprysku nie różniły się od kontroli. Nie obserwowano różnic w wyglądzie blaszek liściowych pomiędzy kontrolą a liśćmi z roślin po oprysku herbicydem, po dłuższych czasach od oprysku (po 34, 41 i 48 dniach).

W ramach obserwacji w TEM, w ultrastrukturze komórek liści roślin *G. robertianum* potraktowanych herbicydem obserwowano m.in., że w komórkach, epidermy dolnej i górnej, miękiszu i w wakuolach występowało więcej elektronogęstych złogów niż w kontroli, zwłaszcza po krótszym czasie od oprysku niż po dłuższym. Ponadto w zależności od czasu po oprysku różny był wygląd tych złogów – przy krótszych czasach obserwowano liczne, drobne złogi a przy dłuższych czasach złogi mniej liczne, ale bardziej zbite i większe. Elektronogęste złogi, jak również kłaczkowate substancje pojawiały się także w komórkach roślin kontrolnych, zwłaszcza w starszych liściach. Największe zaburzenia w ultrastrukturze komórek liści obserwowano w przypadku roślin potraktowanych wyższą dawką herbicydu, w liściach, które pojawiły się 2 tygodnie po oprysku. Widoczne były tutaj m.in. uszkodzenia floemu w wiązce przewodzącej oraz plazmoliza w komórkach miękiszu gąbczastego. Znacznie mniejsze zmiany obserwowano w ultrastrukturze komórek liści, które pojawiły się tydzień po oprysku lub tych, które były już na roślinie w dniu oprysku (TABLICE XVIII, XIX). Pomimo początkowych zmian w ultrastrukturze komórek liści roślin poddanych opryskom po około 30 dniach nastąpiła ich całkowita

regeneracja. Po tym czasie wyglądem nie różniły się one od kontroli. Uzyskane wyniki pokazały, że reakcja roślin *G. robertianum* na herbicyd Roundup jest bardzo złożona. Rośliny nie były całkowicie niszczone a z czasem następowała regeneracja uszkodzonych liści.

IV.5.2. CHLOROZY NA LIŚCIACH

Celem było zbadanie chloroz pojawiających się na najmłodszych liściach roślin *G. robertianum* po oprysku herbicydu Roundup. Zastosowano dawkę pięcioletnią herbicydu, stosowaną na torach. Badano rośliny z torowych populacji z: Walił-Stacji (Wal-St (2008)) i Białegostoku Fabrycznego (BF (2013)), oraz leśnej populacji z Zajezierec (Zaj-Las (2014)).

OBSERWACJE: MAKROSKOPOWE, W MIKROSKOPIE ŚWIETLNYM I FLUORESCENCYJNYM

Po około 2-3 tygodniach po oprysku herbicydem zaobserwowano chlorozę między żyłkową na najmłodszych liściach jedynie u roślin *G. robertianum* z Białegostoku. Nie obserwowano zahamowania wzrostu najmłodszych liści u roślin z tej populacji. Najmniej uszkodzone najmłodsze liście (brak nekroz) wystąpiły u roślin z Białegostoku. Dalsze obserwacje makroskopowe wykazały stopniowy zanik chloroz u roślin z Białegostoku oraz stopniowe usychanie roślin z populacji z Walił i Zajezierec po pięcioletniej dawce herbicydu. Całkowite zamarcie roślin z tych populacji nastąpiło po 1,5-2 miesiącach od oprysku herbicydem. Po oprysku herbicydem starszych roślin (wiek: 11 miesięcy), jedynie u roślin z Walił i Zajezierec nastąpiło całkowite zahamowanie wzrostu najmłodszych liści. Nie obserwowano takiej reakcji podczas badań wstępnych, gdzie badano młodsze rośliny (wiek: 2,5 i 9 miesięcy) (TABLICA XX).

W trakcie obserwacji w mikroskopie świetlnym i fluorescencyjnym liści roślin kontrolnych z Walił i Zajezierec nie zaobserwowano chloroz, ani obniżenia fluorescencji chlorofilu (TABLICA XXI). Po około 2-3 tygodniach od oprysku na liściach rośliny *G. robertianum* z Białegostoku widoczne były chlorozy między żyłkowe. W mikroskopie fluorescencyjnym widać było, że w miejscach wystąpienia chloroz na powierzchni blaszek liściowych nastąpiło obniżenie fluorescencji chlorofilu u rośliny z Białegostoku. Obniżenie fluorescencji chlorofilu wystąpiło głównie w miękiszu gąbczastym. Widoczne były także przewężenia pomiędzy wiązkami przewodzącymi (ścienienie blaszki liściowej), których nie obserwowano na liściach z roślin kontrolnych (TABLICA XXI).

OBSERWACJE W SKANINGOWYM MIKROSKOPIE ELEKTRONOWYM

Struktura liści kontrolnych rośliny *G. robertianum* z Białegostoku była typowa (TABLICE XXII-XXIV). W przypadku rośliny z Białegostoku po oprysku herbicydem Roundup struktura najmłodszych liści z chlorozami była zróżnicowana. W przypadku liści z najmocniej widocznymi makroskopowo chlorozami między żyłkowymi na powierzchni liści obserwowano silne obkurczenie komórek epidermy górnej w rejonach między żyłkami. Im mniej widoczne na liściach chlorozy, tym obkurczenie epidermy górnej było słabsze. Nie obserwowano obkurczenia epidermy dolnej ani górnej nad wiązkami przewodzącymi. Na przekrojach przez blaszki liściowe

liści z chlorozami widać było obkurczenie komórek miękiszu palisadowego i gąbczastego, szczególnie wyraźne na obszarach między wiązkami przewodzącymi (TABLICE XXV, XXVI). Podsumowując, wykazano obniżenie fluorescencji chlorofilu w miejscach wystąpienia chloroz na blaszkach liściowych u roślin po oprysku herbicydem Roundup. Na liściach, gdzie chlorozy powstałe po oprysku roślin herbicydem zaczęły stopniowo zanikać obserwowano mniej zaburzoną strukturę liści w SEM, niż na liściach, gdzie chlorozy były wciąż dobrze widoczne.

IV.5.3. PORÓWNANIE REAKCJI NA HERBICYD ROŚLIN Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH

Celem badań było sprawdzenie, czy występują różnice w reakcji roślin z populacji torowych i leśnych na herbicyd. Zastosowano jednorazową dawkę herbicydu stosowaną na torach kolejowych. Do obserwacji makroskopowych wykorzystano rośliny z populacji torowych z: Białegostoku Fabrycznego – BF (2013), Walił-Stacji – Wal-St (2008) oraz Wal-St-rampa (2015/16) i Zubek Białostockich – ZB (2013), oraz rośliny z populacji leśnych z: Zajeziere – Zaj-Las (2014) i Gródka – Gr-Las1 (2015). Do badań w TEM wybrano rośliny z populacji torowych: Wal-St-rampa (2015/16) i BF (2013), oraz populacji leśnej Zaj-Las (2014).

OBSERWACJE MAKROSKOPOWE

Rośliny *G. robertianum* z wariantów kontrolnych przez cały okres obserwacji były w dobrym stanie, zaś na ich najmłodszych liściach nie obserwowano jakichkolwiek zmian (TABLICA XXVII). Żadna z roślin kontrolnych nie uschła w trakcie obserwacji.

Po oprysku herbicydem Roundup zarówno w przypadku roślin *G. robertianum* z populacji torowych, jak i leśnych, pierwsze chlorozy między żyłkowe na najmłodszych liściach pojawiły się po około 2 tygodniach. Dalsze obserwacje makroskopowe pokazały, że najmłodsze liście roślin z populacji leśnych z Zajeziere i Gródka w przeciągu miesiąca od oprysku herbicydem usychały, zaś większość roślin zamierała (TABLICA XXVII). Najniższą tolerancję na herbicyd Roundup miały rośliny z populacji leśnej Gródek. Rośliny z populacji leśnej Zajeziere charakteryzowała nieznacznie wyższa tolerancja na herbicyd niż rośliny z populacji z Gródka. Po 35 dniach od oprysku herbicydem Roundup uschło łącznie 75% roślin z obu obserwowanych populacji leśnych (Tab. 10). W przypadku roślin z populacji torowych z Białegostoku Fabrycznego, Walił-Stacji i Zubek Białostockich po upływie miesiąca od oprysku herbicydem zdecydowana większość roślin pozostała żywa. Po 35 dniach od oprysku herbicydem łącznie uschło jedynie około 38% roślin z badanych populacji torowych, czyli niemal dwukrotnie mniej niż w przypadku roślin z populacji leśnych (Tab. 10). W przypadku roślin z populacji torowych tolerancja na jednorazową dawkę herbicydu Roundup stosowaną na torach kolejowych była zróżnicowana. Najwyższą tolerancję na herbicyd wykazywały rośliny ze stacji Zubki Białostockie i Białystok Fabryczny, zaś średnią tolerancję wykazywały rośliny z obu przebadanych populacji torowych z Walił-Stacji (Tab. 10). U najmłodszych liści roślin z Walił i Zubek obserwowano po około miesiącu zarówno chlorozy, jak i nieco zmieniony kształt blaszek liściowych (TABLICA XXVII). Najmniej uszkodzone najmłodsze liście obserwowano u roślin

z Białegostoku – chlorozy były na tych liściach niewielkie lub nie występowały, nie obserwowano także zmienionego kształtu blaszek liściowych (TABLICA XXVII).

TABELA 10. Procent uschniętych i żywych roślin *G. robertianum* z badanych populacji torowych i leśnych po 35 dniach od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę).

Lp.	Akronim populacji	Typ populacji	35 dni od oprysku herbicydem Roundup	
			% roślin uschniętych	% roślin żywych
1.	Zaj-Las (2014)	leśna	74,07	25,93
2.	Gr-Las1 (2015)	leśna	80,00	20,00
3.	Populacje leśne łącznie		75,00	25,00
4.	BF (2013)	torowa	13,33	86,67
5.	Wal-St (2008)	torowa	58,33	41,67
6.	Wal-St-rampa (2015/16)	torowa	50,00	50,00
7.	ZB (2013)	torowa	0,00	100,00
8.	Populacje torowe łącznie		38,46	61,54

OBSERWACJE – MIKROSKOP ŚWIETLNY

Rośliny kontrolne z Zajezierec charakteryzowała typowa budowa liścia, widoczne były ciemne złogi w komórkach i charakterystyczne „szarości” – metabolity wtórne. Nie obserwowano tu zniszczonych komórek (TABLICA XXVIII). W liściach roślin *G. robertianum* z Zajezierec po oprysku herbicydem Roundup obserwowano m.in.: obkurczone komórki miększu palisadowego i gąbczastego, ciemne złogi w komórkach miększu palisadowego, gąbczastego, epidermy górnej i dolnej oraz nagromadzenie charakterystycznych „szarości” w niektórych komórkach (tego typu komórek było więcej niż w kontroli) (TABLICA XXVIII).

W przypadku wariantów z obiema populacjami torowymi z Walił i Białegostoku po oprysku herbicydem Roundup, nie obserwowano obkurczonych komórek miększu. Natomiast obserwowano ciemne złogi w komórkach miększu palisadowego, gąbczastego, epidermy górnej i dolnej oraz nagromadzenie charakterystycznych „szarości” w niektórych komórkach. Tego typu komórek z ciemnymi złogami w wariantach torowych było więcej niż w kontroli i w wariantach z populacją leśną Zaj-Las (2014) po herbicydzie Roundup. Szczególnie dużo komórek z ciemnymi złogami było w wariantach z populacji Wal-St-rampa (2015/16) (TABLICA XXVIII).

OBSERWACJE – TRANSMISYJNY MIKROSKOP ELEKTRONOWY

Obraz w kontroli był typowy. Obserwowano chloroplasty zarówno z ziarnami skrobi, jak i bez, o nie zaburzonej ultrastrukturze. W wakuolach obserwowano kłaczkowatą zawartość oraz nieliczne elektronogęste złogi. Dodatkowe przedziały w wakuolach występowały sporadycznie. Nie obserwowano uszkodzonych komórek (TABLICA XXIX).

U roślin *G. robertianum* z populacji leśnej z Zajezierec po oprysku herbicydem Roundup obserwowano największe zmiany w ultrastrukturze komórek liści, w porównaniu do pozostałych wariantów. Zaobserwowano m.in. tworzenie się licznych dodatkowych przedziałów błonowych w wakuolach i elektronogęste złogi w różnych przedziałach komórkowych o charakterystycznych kształtach, zajmujących znaczną część wakuol. W niektórych wakuolach obserwowano

kłaczkową zawartość. Ponadto, w obu miększach i epidermach obserwowano rozpadające się chloroplasty o uszkodzonej ultrastrukturze (zarówno bez, jak i z ziarnami skrobi). Obserwowano cytoplazmę o zaburzonej strukturze. Widoczne były pęknięte błony komórkowe, przestrzenie periplazmatyczna oraz plazmoliza (TABLICA XXX).

W komórkach liści roślin z populacji torowych z Wali i Białegostoku nie obserwowano plazmolizy komórek, ani uszkodzonych chloroplastów. Obecne były jednak liczne elektronogęste złogi zajmujące niemal całe wakuole. Obserwowano je zarówno w obu miększach, jak i epidermach – przy czym było ich więcej w miększu gąbczastym i epidemie dolnej. Elektronogęstych złogów w komórkach liści było więcej w wariantach z Wali niż Białegostoku. W obu wariantach z populacji torowych, złogów w wakuolach było więcej niż w kontroli i wariantach po oprysku herbicydem roślin z Zajezierc. W obu wariantach z populacji torowych obserwowano chloroplasty zarówno bez, jak i z ziarnami skrobi. W wariantach z Białegostoku, ziarna skrobi w chloroplastach były szczególnie duże, zdecydowanie większe niż w wariantach kontrolnych (TABLICE XXXI, XXXII).

PODSUMOWANIE

Badania pokazały, że rośliny z populacji torowych – w szczególności z Zubek Białostockich i Białegostoku Fabrycznego, charakteryzowała niemal dwukrotnie wyższa tolerancja na herbicyd Roundup niż rośliny z populacji leśnych. Objawiało się to lepszą kondycją zarówno całych roślin z populacji torowych, jak i najmłodszych liści (w tym ich ultrastruktury), w porównaniu do roślin z populacji leśnych. U roślin *G. robertianum* z populacji torowych po oprysku herbicydem nie obserwowano znacząco zmienionej ultrastruktury komórek liści w porównaniu do kontroli. Natomiast rośliny z populacji leśnej po oprysku herbicydem Roundup miały silnie zmienioną ultrastrukturę komórek liści (dobrze widoczne były np. uszkodzenia chloroplastów). Wykazano, że po oprysku herbicydem Roundup zmiany ultrastruktury komórek liści roślin z populacji torowych były mniejsze niż u roślin z populacji leśnych.

IV.5.4. ZAWARTOŚĆ GLIFOSATU I AMPA W ROŚLINACH *G. ROBERTIANUM*

Celem badań było sprawdzenie jaką dawkę herbicydu Roundup otrzymują rośliny *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych, w zależności od wielkości roślin. Do badań wykorzystano rośliny z populacji torowych: Wal-St (2008), Wal-St-rampa (2015/16), BF (2013), ZB (2013), oraz populacji leśnych: Zaj-Las (2014), Gr-Las1 (2015).

Największą liczbę liści miały rośliny z populacji BF (2013), a najmniejszą rośliny z populacji Wal-St-rampa (2015/16) i Zaj-Las (2014). Obserwowane różnice pomiędzy tymi populacjami były istotne statystycznie (FIG. 61). W większości przypadków większą liczbę liści w rozetach miały rośliny *G. robertianum* z populacji torowych niż leśnych. Obserwowana różnica pomiędzy populacjami torowymi a leśnymi była istotna statystycznie (FIG. 61).

W przypadku średniej świeżej masy rozet roślin *G. robertianum* z badanych populacji torowych i leśnych, najcięższe rozety miały rośliny z populacji torowej BF (2013)

i Wal-St (2008), a najlżejsze rośliny z populacji leśnej Gr-Las1 (2015). Obserwowane różnice były istotne statystycznie (FIG. 62). W większości przypadków większy ciężar rozet charakteryzował rośliny *G. robertianum* z populacji torowych niż leśnych. Różnica ciężaru rozet pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych była istotna statystycznie (FIG. 62).

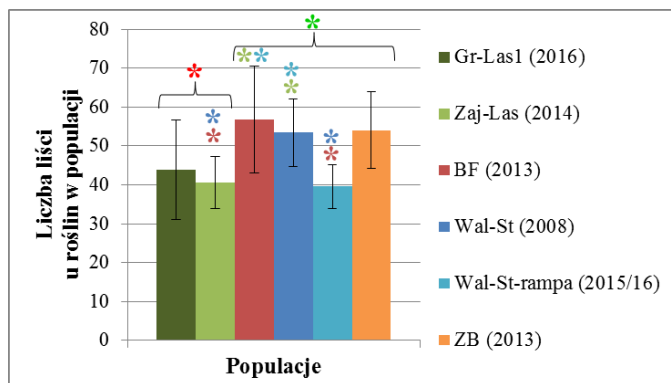


FIGURA 61. Liczba liści w rozetach u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych wykorzystanych do badań chemicznych. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi; kłmą i gwiazdką oznaczono różnice istotne statystycznie dla danego typu populacji (torowe / leśne) (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

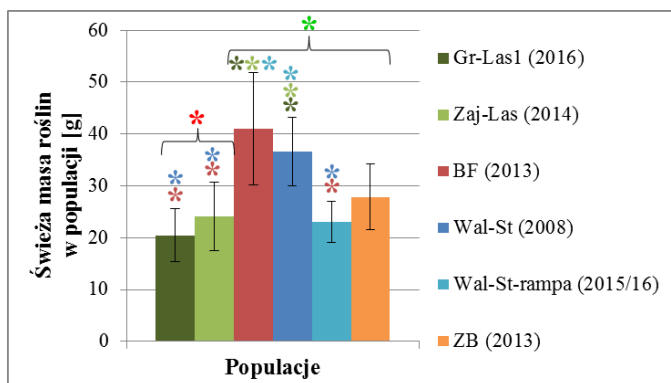


FIGURA 62. Świeża masa rozet [g] u roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych wykorzystanych do badań chemicznych. Gwiazdkami (*) oznaczono różnice istotne statystycznie pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi; kłmą i gwiazdką oznaczono różnice istotne statystycznie dla danego typu populacji (torowe / leśne) (testy Kruskala-Wallisa i U Manna-Whitneya; poziom istotności $\alpha = 0,01$).

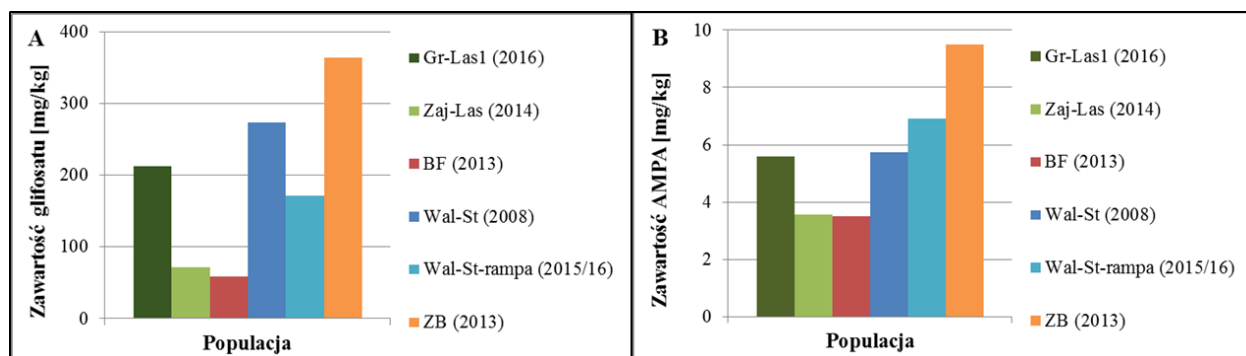


FIGURA 63. Średnia zawartość glifosatu (A) i AMPA (B) [mg/kg] w badanych próbkach roślinnych z poszczególnych populacji torowych i leśnych roślin *G. robertianum*.

Zarówno zawartości glifosatu, jak i AMPA w badanych populacjach były dość zróżnicowane. Najwyższą zawartość glifosatu i AMPA stwierdzono w próbce z roślinami

z populacji ZB (2013) a najniższą w próbce z populacji BF (2013) (FIG. 63). Wyższe zawartości obu związków występowały w większości przypadków w próbkach roślinnych z populacji torowych niż leśnych. Średnia zawartość glifosatu w populacjach torowych wynosiła 197,72 mg/kg, a AMPA 5,67 mg/kg. Natomiast średnia zawartość glifosatu w populacjach leśnych wynosiła 95,52 mg/kg, a AMPA 3,90 mg/kg.

Wykonano analizę składowych głównych (PCA). Zmiennymi były: liczba roślin w próbce (N), średnia liczba liści oraz średnia świeża masa roślin w próbce, zawartość glifosatu i AMPA w danej próbce. Sprawdzano w jakim stopniu wyniki uzyskane z analiz chemicznych zależą od wyglądu roślin wykorzystanych do badań chemicznych. Wyznaczono wartości własne macierzy korelacji (TAB. 11). Pierwsza główna składowa odpowiedzialna była za około 42% informacji zawartych w zmiennych wejściowych a druga za około 37% informacji.

TABELA 11. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o liczbie roślin (N), liczbie liści, świeżej masie roślin, zawartości glifosatu i AMPA w danej próbce wykorzystanej do analiz chemicznych. Tabela przedstawia wartości własne macierzy korelacji i statystyki pokrewne.

Składowa główna	Wartości własne (korelacje), statystyki pokrewne			
	Wartość własna	% ogółu wariancji	Skumulowana wartość własna	% skumulowany
1	2,086475	41,72951	2,086475	41,7295
2	1,866243	37,32486	3,952718	79,0544
3	0,830233	16,60467	4,782952	95,6590
4	0,175287	3,50574	4,958239	99,1648
5	0,041761	0,83523	5,000000	100,0000

Silnie skorelowane były ze sobą dane uzyskane z pomiarów świeżej masy, liczby liści i liczby roślin w próbce (N) – I grupa danych. Mocno skorelowane były także dane o zawartości glifosatu i AMPA w próbkach – II grupa danych. Natomiast te dwie grupy danych nie były ze sobą skorelowane. Większość informacji zawartych w badanych zmiennych, poza liczbą roślin w próbce (N), była przenoszona przez główne składowe. Za położenie punktów w przestrzeni PC1 odpowiadała w największym stopniu zmienna „liczba liści na próbkę” oraz „zawartość glifosatu”. Natomiast za położenie punktów w przestrzeni PC2 odpowiadała głównie zmienna „zawartość AMPA” oraz „zawartość glifosatu”. W przestrzeni dwóch głównych składowych nastąpiło rozdzielenie badanych próbek na dwie grupy populacji torowych – Wal-St (2008), BF (2013) i ZB (2013) oraz na dwie grupy złożone z populacji leśnych – Gr-Las (2014) i Zaj-Las (2014) oraz populacji torowej Wal-St-rampa (2015/16) (FIG. 64).

Wykazano, że rośliny podczas oprysku pobierają różne dawki herbicydu Roundup, pomimo tej samej dawki herbicydu zastosowanej do oprysków. Stwierdzono wyższe średnie zawartości glifosatu i AMPA w roślinach z populacji torowych niż leśnych. Rośliny z populacji torowych charakteryzowała wyższa liczba liści w rozetach oraz wyższa świeża masa części nadziemnych niż rośliny z populacji leśnych. Najprawdopodobniej zawartość glifosatu i AMPA w roślinach po oprysku herbicydem zależy od liczby liści w rozecie i ich rozmieszczenia na roślinie oraz powierzchni roślin, która miała bezpośredni kontakt z herbicydem.

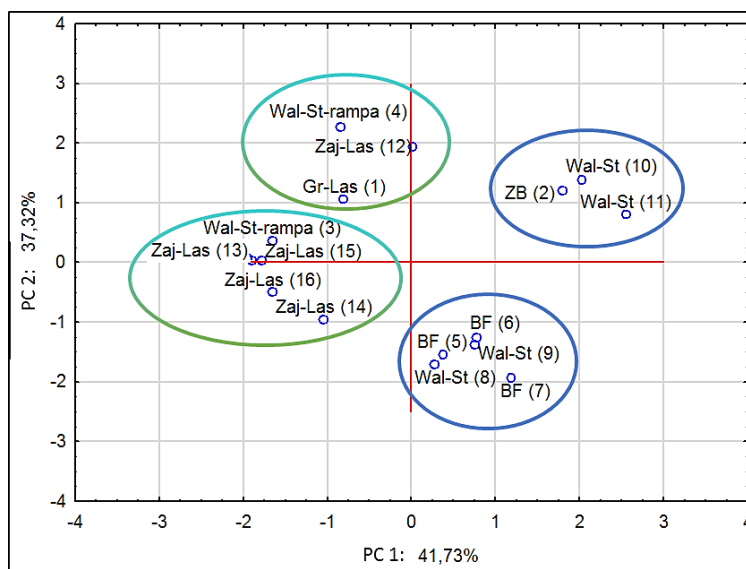


FIGURA 64. Wyniki analizy składowych głównych (PCA) przeprowadzonej na macierzy zawierającej dane o liczbie roślin (N), liczbie liści, świeżej masie roślin, zawartości glifosatu i AMPA w danej próbce wykorzystanej do analiz chemicznych. Wykres przedstawia położenie punktów odpowiadających analizowanym przypadkom w przestrzeni pierwszej (PC1) i drugiej (PC2) głównej składowej, wyjaśniających odpowiednio 41,73% i 37,32% ogólnej wariancji. Zielono-morskimi i niebieskimi okręgami oznaczono wyodrębnione grupy populacji.

IV.5.5. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA KWITNIENIE ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Celem badań było sprawdzenie wpływu herbicydu Roundup na kwitnące rośliny *G. robertianum* z populacji torowych: Wal-St (2008) i Wal3 (2014), oraz leśnej populacji Zaj-Las (2014). W przypadku roślin *G. robertianum* z populacji Wal-St (2008) traktowanych herbicydem Roundup po pierwszym oprysku (czas: 0 dni; niższa dawka herbicydu) nie obserwowano dużych różnic w liczbie pąków na roślinach w stosunku do kontroli. Po drugim oprysku herbicydem (czas: 21 dni; wyższa dawka herbicydu) nastąpił gwałtowny wzrost liczby pąków na roślinach w stosunku do kontroli (FIG. 65A). Od 7 dnia aż do końca doświadczenia obserwowano większą liczbę kwiatów na roślinach z populacji Wal-St (2008) po oprysku herbicydem niż w kontroli, gdzie liczba kwiatów na roślinie była względnie stała (FIG. 65B). Od 21 dnia doświadczenia u roślin kontrolnych z populacji Wal-St (2008) obserwowano więcej owoców niż na roślinach po oprysku herbicydem (FIG. 65C).

U roślin *G. robertianum* z populacji Wal3 (2014), w przypadku roślin traktowanych herbicydem Roundup po pierwszym oprysku nie obserwowano dużych różnic w liczbie pąków na roślinach w stosunku do kontroli. Tak samo, jak w przypadku roślin z populacji Wal-St (2008) dopiero po drugim oprysku herbicydem zaobserwowano gwałtowny wzrost liczby pąków na roślinach z populacji Wal3 (2014) w stosunku do kontroli. Jednak wzrost ten nie był aż tak wysoki, jak w populacji Wal-St (2008) (FIG. 65D). Od 7 dnia obserwowano większą liczbę kwiatów na roślinach z populacji Wal3 (2014) po oprysku herbicydem w stosunku do kontroli, gdzie liczba kwiatów na roślinie była względnie stała przez cały okres doświadczenia (FIG. 65E). Od 7 dnia u roślin kontrolnych z populacji Wal3(2014) obserwowano więcej owoców niż na roślinach po oprysku herbicydem (FIG. 65F).

Tydzień po pierwszym oprysku herbicydem roślin *G. robertianum* z populacji leśnej Zaj-Las (2014) zaobserwowano zwiększenie średniej liczby pąków na roślinach w stosunku do kontroli. Największą liczbę pąków na roślinach z populacji leśnej po drugim oprysku odnotowano tydzień wcześniej niż w przypadku populacji torowych (FIG. 65G). Podobnie jak u roślin *G. robertianum* z populacji torowych, u roślin z populacji Zaj-Las (2014) już od 7 dnia trwania doświadczenia obserwowano większą liczbę kwiatów na roślinach po oprysku herbicydem w stosunku do kontroli, gdzie liczba kwiatów na roślinie była względnie stała przez cały okres badań (FIG. 65H). Inaczej niż w przypadku populacji torowych, u roślin z populacji leśnej Zaj-Las (2014) nie obserwowano dużych różnic w średniej liczbie owoców między roślinami kontrolnymi a roślinami po oprysku herbicydem Roundup (FIG. 65I).

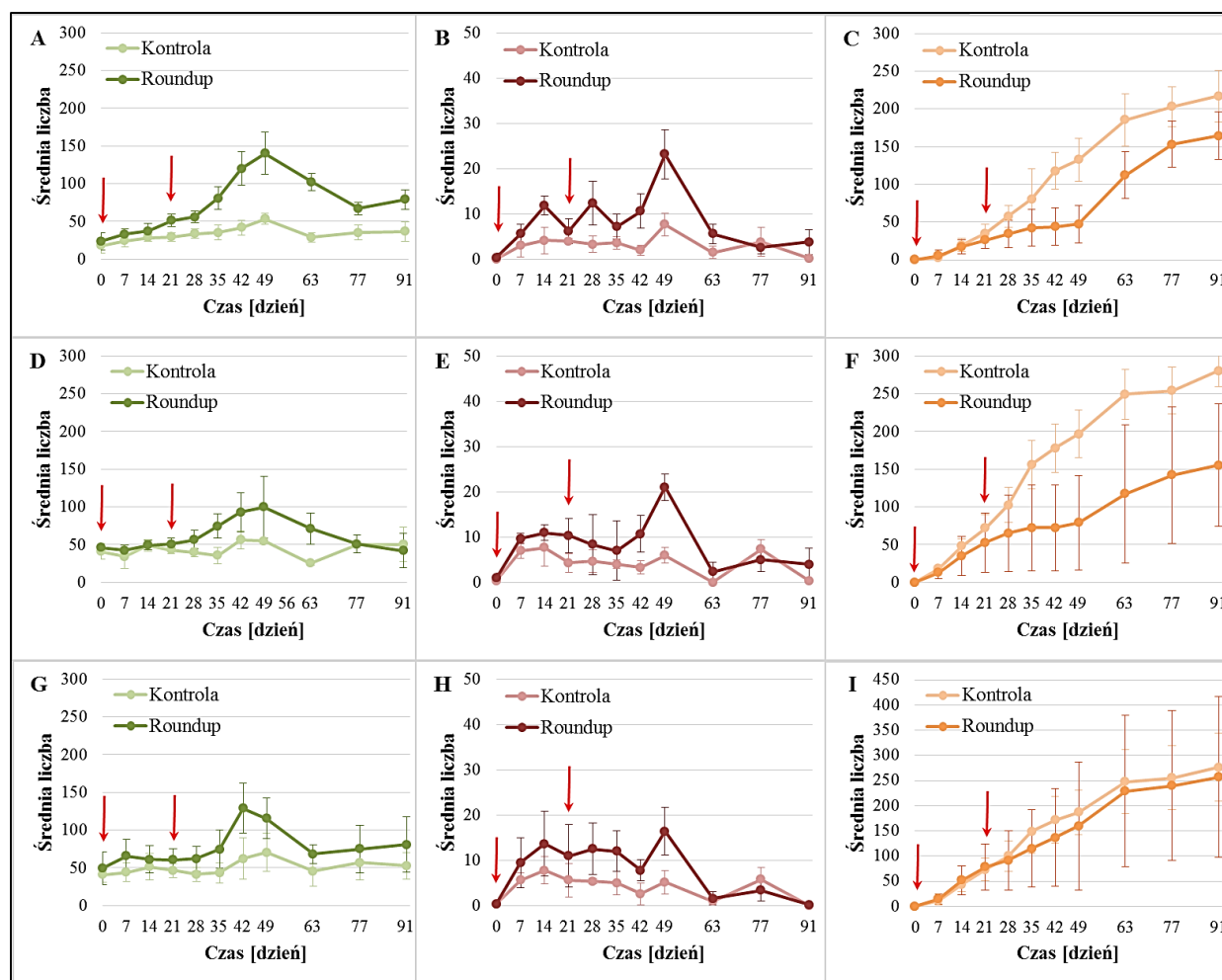


FIGURA 65. Średnia liczba: pąków (A, D, G), kwiatów (B, E, H), owoców (C, F, I) na roślinach *G. robertianum* z kontroli oraz poddanych opryskowi herbicydem Roundup, z populacji torowych Wal-St (2008) (A-C) i Wal3 (2014) (D-F), oraz z populacji leśnej Zaj-Las (2014) (G-I). Oprysk herbicydem (czerwone strzałki): w dniu startu doświadczenia (60 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę), oraz po 21 dniach od pierwszego oprysku (120 mg/l glifosatu, 20 ml roztworu na roślinę).

Podsumowując, we wszystkich badanych populacjach po opryskach herbicydem Roundup obserwowano wzrost liczby pąków i kwiatów na roślinach a spadek liczby owoców. Oprysk herbicydem miał największy stymulujący wpływ na wytwarzanie pąków i kwiatów na rośliny

z populacji torowych w porównaniu do populacji leśnej. Oprysk herbicydem mocniej hamował wytwarzanie owoców w populacjach torowych niż leśnej.

IV.6. BADANIA NAD BIOLOGIĄ REPRODUKCJI ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Celem badań było poznanie biologii reprodukcji roślin *G. robertianum*, w szczególności roślin z Walił-Stacji, oraz wykazanie ewentualnych różnic w biologii reprodukcji pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi. Do pierwszych obserwacji wykorzystano kwitnące rośliny *G. robertianum* pobrane z terenu i przesadzone do doniczek, z populacji torowych z Walił: Wal-St-rampa (2015) i Wal-St-napis (2015) oraz z populacji leśnej Zaj-Las (2015).

W kontroli (**A**), w badanych populacjach zakwitło powyżej 82% z obserwowanych pąków – najwięcej w populacji Wal-St-napis (2015) (~89%) a najmniej w populacji Wal-St-rampa (2015) (~82%). Z obserwowanych pąków kontrolnych najwięcej zaowocowało w populacji Wal-St-napis (2015) (~77%) a najmniej w populacji Wal-St-rampa (2015) (~57%) (FIG. 66). Jediną różnicą w wyglądzie pąków i kwiatów pomiędzy roślinami z populacji torowych i leśnych był kolor pąków, ogonków kwiatowych i działek kielicha. W populacjach torowych były one ciemno-czerwone, zaś w populacji leśnej jasnozielone (TABLICA XXXIII-XXXV).

W wariancie (**B**), gdzie obserwowano pąki z usuniętym znamionem słupka, które były dodatkowo zaizolowane woreczkiem z organzy (sprawdzano wystąpienie agamospermii), zakwitło zdecydowanie mniej pąków w poszczególnych populacjach niż w odpowiednich kontrolach. W populacji Zaj-Las (2015) zakwitło ~44% obserwowanych pąków, w populacji Wal-St-rampa (2015) ~27%, zaś w populacji Wal-St-napis (2015) jedynie 20%. W żadnej z badanych populacji nie zaobserwowano owocowania. Nie stwierdzono wystąpienia agamospermii u żadnej z badanych populacji (FIG. 66).

W wariancie (**C**), gdzie sprawdzano wystąpienie samozapylenia (izolacja pąków woreczkiem z organzy), w populacji Wal-St-napis (2015) 100% z pąków zakwitło. W pozostałych populacjach zakwitło odpowiednio ~64% pąków w populacji Zaj-Las (2015) i 30% w populacji Wal-St-rampa (2015). W żadnej z populacji nie zaobserwowano owocowania. Nie stwierdzono wystąpienia samozapylenia u żadnej z populacji (FIG. 66).

W wariancie (**D**), gdzie sprawdzano wystąpienie zjawiska agamospermii, ale usuwano tylko znamię słupka, bez dodatkowej izolacji woreczkiem z organzy, najwięcej pąków zakwitło w populacji Wal-St-napis (2015) (~54%). W populacji Zaj-Las (2015) zakwitło 50% z pąków, a w Wal-St-rampa (2015) – 33%. W żadnym z wariantów nie zaobserwowano owocowania. Nie stwierdzono wystąpienia agamospermii u żadnej z badanych populacji (FIG. 66).

W wariancie (**E**), w którym obserwowano, czy zapyłone kwiaty (100% z obserwowanych pąków) po usunięciu znamiona słupka będą w stanie owocować, we wszystkich populacjach obserwowano owocowanie niższe o około 1-4% niż w odpowiednich wariantach kontrolnych. Po zapyleniu usunięcie znamiona słupka miało niewielki wpływ na owocowanie roślin (FIG. 66).

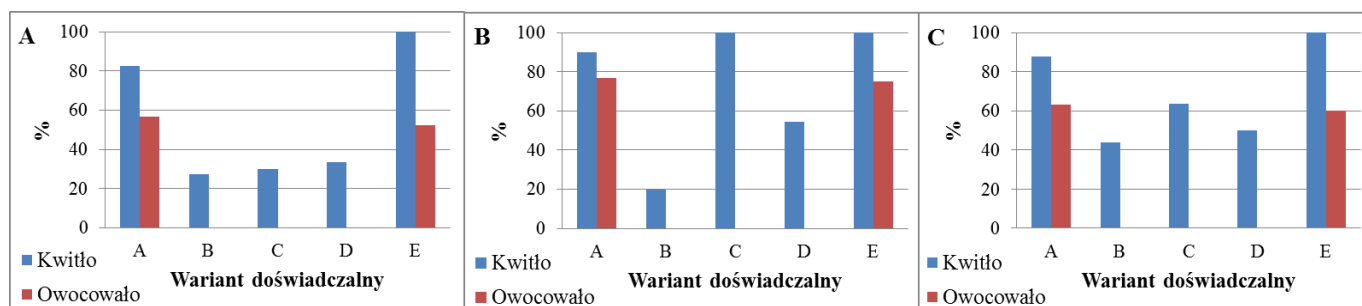


FIGURA 66. Procent kwitnących i owocujących z obserwowanych pąków w danym wariancie, w badanych populacjach: Wal-St-rampa (2015) (A), Wal-St-napis (2015) (B) i Zaj-Las (2015) (C). **Warianty testowe:** A. kontrola; B. kwiaty w stadium pąka z usuniętym znamionem słupka, zaizolowane woreczkiem z organzy (sprawdzano apomiksje – agamospermię); C. kwiaty w stadium pąka zaizolowane woreczkiem z organzy (sprawdzano samozapylenie); D. pąki z usuniętym znamionem słupka, ale bez izolatora (sprawdzano apomiksje – agamospermię); E. kwiaty po zapyleniu, z usuniętym znamionem słupka, bez izolacji.

Aby, potwierdzić uzyskane wyniki rośliny *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St-rampa (2015) oraz leśnej Zaj-Las (2015) przesadzono do gruntu i ponownie zbadano. Przebadano także rośliny pochodzące ze szklarni z populacji torowych Wal-St (2008) i Wal3 (2014), oraz rośliny z populacji leśnej Zaj-Las (2014), które przesadzono do gruntu. Jednak i tym razem, ani u roślin *G. robertianum* z populacji torowej, ani u roślin z populacji leśnej nie wystąpiło zjawisko agamospermii czy samozapylenia.

Podsumowując, nie zaobserwowano, aby w torowych i leśnych populacjach roślin *G. robertianum*, wystąpiło zjawisko agamospermii czy samozapylenia. Z kwiatów powstawały owoce dopiero po zapyleniu. Na uzyskane wyniki nie miało wpływu, czy rośliny pochodziły z terenu, czy ze szklarni ani warunki ich przechowywania (posadzenie w doniczkach lub bezpośrednio w gruncie).

IV.7. BADANIA GENETYCZNE ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH

Przeprowadzono badania genetyczne, aby sprawdzić, czy obserwowane różnice pomiędzy roślinami *G. robertianum* z Walił-Stacji a pozostałymi populacjami torowymi i leśnymi mają podłoże genetyczne. Celem badań było sprawdzenie rangi taksonomicznej nowo odkrytej formy *G. robertianum* z Walił-Stacji. Sprawdzano także, czy pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi występują różnice genetyczne.

IV.7.1. PODSTAWOWE PARAMETRY RÓŻNORODNOŚCI GENETYCZNEJ BADANYCH POPULACJI

W TABELACH 12 i 13 przedstawiono podstawowe parametry różnorodności genetycznej wszystkich badanych populacji *G. robertianum* – oddzielnie dla każdej z matryc.

W przypadku matrycy 1 (TAB. 12) najwyższą liczbę polimorficznych *loci* stwierdzono w populacji ZB-Las (2014), czyli populacji zlokalizowanej w pobliżu końca linii kolejowej nr 37. Następnie najwyższą liczbę polimorficznych *loci* stwierdzono odpowiednio w populacjach Zaj-Las (2008), ZB (2013) oraz Wal-St (2008). W populacjach tych stwierdzono także najwyższą proporcję polimorficznych *loci* oraz najwyższą heterozygotyczność oczekiwaną (TAB. 12).

TABELA 12. Podstawowe parametry różnorodności genetycznej dla roślin *G. robertianum* z torowych ^a i leśnych ^b populacji z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśnych populacji porównawczych ^c, obliczone na podstawie matrycy 1.

Lp.	Populacja	Liczba roślin	Liczba loci	Liczba polimorficznych loci (przedział ufności 5%)	Proporcja polimorficznych loci (przedział ufności 5%) [%]	Hj (heterozygotyczność oczekiwana)	Błąd standardowy dla Hj	DW (frequency-down-weighted marker values)
1.	BF (2013) ^a	10	265	175	66,0	0,22847	0,01153	17,38
2.	B-Z-Las (2014) ^b	10	265	169	63,8	0,22029	0,01163	18,67
3.	L-Zaj (2013) ^a	10	265	150	56,6	0,16720	0,01035	13,93
4.	Zaj-Las (2008) ^b	10	265	197	74,3	0,27450	0,01146	28,65
5.	Zed (2014) ^a	10	265	142	53,6	0,19074	0,01249	10,83
6.	Zed-Las (2014) ^b	10	265	150	56,6	0,16444	0,01027	13,53
7.	Wal-St (2008) ^a	10	265	181	68,3	0,24115	0,01160	23,51
8.	Wal-Las (2013) ^b	10	265	164	61,9	0,21024	0,01149	16,29
9.	Grzyb-Las (2014) ^b	10	265	160	60,4	0,18673	0,01113	15,31
10.	W-S3C (2013) ^a	10	265	153	57,7	0,18720	0,01132	14,31
11.	St-ZB (2014) ^a	10	265	138	52,1	0,16963	0,01121	13,15
12.	ZB (2013) ^a	10	265	191	72,1	0,25114	0,01138	26,21
13.	ZB-Las (2014) ^b	10	265	201	75,8	0,25958	0,01158	21,84
14.	KPN (2013) ^c	10	265	162	61,1	0,20787	0,01191	14,79
15.	Francja (2013) ^c	10	265	147	55,5	0,18631	0,01158	13,61

TABELA 13. Podstawowe parametry różnorodności genetycznej dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Wali ^a i leśnych z Zajezierec ^b (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.), obliczone na podstawie 2.

Lp.	Populacja	Liczba roślin	Liczba loci	Liczba polimorficznych loci (przedział ufności 5%)	Proporcja polimorficznych loci (przedział ufności 5%) [%]	Hj (heterozygotyczność oczekiwana)	Błąd standardowy dla Hj	DW (frequency-down-weighted marker values)
1.	Wal-St (2008) ^a	10	265	181	68,3	0,24115	0,01160	40,92
2.	Wal3 (2013) ^a	10	265	178	67,2	0,22415	0,01136	40,03
3.	Wal-St-napis (2015) ^a	10	265	130	49,1	0,13895	0,01010	22,28
4.	Wal-St-rampa (2015) ^a	10	265	128	48,3	0,13135	0,00988	21,90
5.	Zaj-Las (2008) ^b	10	265	197	74,3	0,27450	0,01146	48,65
6.	Zaj-Las (2013) ^b	10	265	191	72,1	0,24675	0,01164	48,71
7.	Zaj-Las (2015) ^b	10	265	135	50,9	0,14039	0,01015	25,51

W przypadku parametru DW, w matrycy 1 był on najwyższy w populacji Zaj-Las (2008), czyli populacji zlokalizowanej w lesie w pobliżu środka linii kolejowej nr 37. Parametr DW był także wysoki w populacjach ZB (2013), Wal-St (2008) oraz ZB-Las (2014) (TAB. 12).

W matrycy 2 (TAB. 13), gdzie analizowano populacje torowe z Walił i leśne z Zajezierec z różnych lat, wyższą liczbą polimorficznych *loci* charakteryzowały się populacje z Zajezierec i Walił z 2008 i 2013 r., w porównaniu do populacji z Zajezierec i Walił z 2015 r. Populacje Zaj-Las (2008) i Zaj-Las (2013) charakteryzowała wyższa liczba polimorficznych *loci* niż populacje Wal-St (2008) i Wal3 (2013). Podobne wyniki uzyskano w przypadku pozostałych badanych parametrów różnorodności genetycznej: proporcji polimorficznych *loci*, heterozygotyczności oczekiwanej oraz parametru DW (TAB. 13).

IV.7.2. STRUKTURA GENETYCZNA BADANYCH POPULACJI

W poniższych tabelach przedstawiono, oddzielnie dla każdej z matryc, wartości:

- dystansu genetycznego Nei pomiędzy parami populacji (TAB. 14, 15);
- dystansu genetycznego Reynolds'a pomiędzy parami populacji (TAB. 16, 17);
- F_{ST} (współczynnik utrwalenia) pomiędzy parami populacji (TAB. 18, 19).

W matrycy 1 wartości dystansu genetycznego Nei pomiędzy parami badanych populacji były bardzo niskie (poniżej wartości 0,02). Uzyskane wartości dystansu genetycznego Nei, dla populacji leśnych i torowych z okolic linii kolejowej nr 37 były niskie również przy porównaniu do populacji z miejsc odniesienia KPN i Francja. Najniższa wartość dystansu genetycznego Nei pomiędzy parami populacji dla matrycy 1 wystąpiła dla pary: ZB (2013) – populacja torowa z końca linii nr 37 i ZB-Las (2014) – populacja leśna zlokalizowana w pobliżu populacji ZB (2013). W matrycy 1 stwierdzono bardzo niską wartość dystansu genetycznego Nei także dla pary dwóch populacji torowych z początku linii kolejowej nr 37 – BF (2013) oraz z jej końca – ZB (2013) (TAB. 14). W matrycy 2 najniższe wartości dystansu genetycznego Nei stwierdzono dla pary populacji: torowej Wal-St (2008) i leśnej Zaj-Las (2008). Dla par populacji z Walił i Zajezierec w kolejnych latach dystans genetyczny Nei był również niski (TAB. 15).

W przypadku dystansu genetycznego wg Reynolds'a uzyskane wartości dla wszystkich par populacji w matrycy 1 były wyższe niż te uzyskane przy wyliczeniu dystansu genetycznego Nei. Dla dystansu genetycznego wg Reynolds'a powtórzyła się jedynie zależność dla pary populacji ZB (2013) i ZB-Las (2014), gdzie wartości dystansu genetycznego były najniższe w porównaniu do pozostałych par populacji (TAB. 16). Dla matrycy 2 wartości dystansu genetycznego wg Reynolds'a dla par populacji były wyższe od wartości uzyskanych przy wyliczeniu dystansu genetycznego Nei. Dla matrycy 2 wszystkie zależności stwierdzone dla dystansu genetycznego Nei zostały również zaobserwowane dla dystansu genetycznego wg Reynolds'a (TAB. 17).

TABELA 14. Dystans genetyczny Nei pomiędzy parami populacji (LYNCH, MILLIGAN 1994) dla roślin *G. robertianum* z torowych ^a i leśnych ^b populacji z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśnych populacji porównawczych ^c, obliczone na podstawie matrycy 1.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Francja (2013) ^c	KPN (2013) ^c	L-Zaj (2013) ^a	Zed-Las (2014) ^b	Zed (2014) ^a	W-S3C (2013) ^a	Grzyb-Las (2014) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	St-ZB (2014) ^a	BF (2013) ^a	B-Z-Las (2014) ^b	ZB (2013) ^a	ZB-Las (2014) ^b	Wal-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,0339	0,0255	0,0416	0,0531	0,0432	0,0466	0,0409	0,0167	0,0484	0,0352	0,0576	0,0294	0,0283	0,0603
Francja (2013) ^c	0,0339	0,0000	0,0195	0,0331	0,0412	0,0339	0,0378	0,0524	0,0448	0,0547	0,0346	0,0633	0,0364	0,0327	0,0572
KPN (2013) ^c	0,0255	0,0195	0,0000	0,0134	0,0303	0,0230	0,0322	0,0549	0,0345	0,0655	0,0278	0,0591	0,0226	0,0201	0,0584
L-Zaj (2013) ^a	0,0416	0,0331	0,0134	0,0000	0,0254	0,0208	0,0215	0,0665	0,0546	0,0719	0,0333	0,0664	0,0477	0,0415	0,0648
Zed-Las (2014) ^b	0,0531	0,0412	0,0303	0,0254	0,0000	0,0155	0,0220	0,0600	0,0614	0,0643	0,0357	0,0536	0,0560	0,0499	0,0399
Zed (2014) ^a	0,0432	0,0339	0,0230	0,0208	0,0155	0,0000	0,0134	0,0464	0,0471	0,0506	0,0310	0,0600	0,0413	0,0395	0,0501
W-S3C (2013) ^a	0,0466	0,0378	0,0322	0,0215	0,0220	0,0134	0,0000	0,0625	0,0498	0,0637	0,0282	0,0530	0,0417	0,0461	0,0461
Grzyb-Las (2014) ^b	0,0409	0,0524	0,0549	0,0665	0,0600	0,0464	0,0625	0,0000	0,0455	0,0326	0,0444	0,0649	0,0473	0,0354	0,0496
Zaj-Las (2008) ^b	0,0167	0,0448	0,0345	0,0546	0,0614	0,0471	0,0498	0,0455	0,0000	0,0645	0,0293	0,0435	0,0239	0,0207	0,0483
St-ZB (2014) ^a	0,0484	0,0547	0,0655	0,0719	0,0643	0,0506	0,0637	0,0326	0,0645	0,0000	0,0384	0,0473	0,0567	0,0478	0,0416
BF (2013) ^a	0,0352	0,0346	0,0278	0,0333	0,0357	0,0310	0,0282	0,0444	0,0293	0,0384	0,0000	0,0221	0,0097	0,0136	0,0199
B-Z-Las (2014) ^b	0,0576	0,0633	0,0591	0,0664	0,0536	0,0600	0,0530	0,0649	0,0435	0,0473	0,0221	0,0000	0,0331	0,0276	0,0135
ZB (2013) ^a	0,0294	0,0364	0,0226	0,0477	0,0560	0,0413	0,0417	0,0473	0,0239	0,0567	0,0097	0,0331	0,0000	0,0076	0,0350
ZB-Las (2014) ^b	0,0283	0,0327	0,0201	0,0415	0,0499	0,0395	0,0461	0,0354	0,0207	0,0478	0,0136	0,0276	0,0076	0,0000	0,0350
Wal-Las (2013) ^b	0,0603	0,0572	0,0584	0,0648	0,0399	0,0501	0,0461	0,0496	0,0483	0,0416	0,0199	0,0135	0,0350	0,0350	0,0000

TABELA 15. Dystans genetyczny Nei pomiędzy parami populacji (LYNCH, MILLIGAN 1994) dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Wali ^a i leśnych z Zajezierec ^b (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.), obliczone na podstawie matrycy 2.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Wal-St-rampa (2015) ^a	Wal-St-napis (2015) ^a	Zaj-Las (2015) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	Wal3 (2013) ^a	Zaj-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,0500	0,0565	0,0676	0,0167	0,0436	0,0603
Wal-St-rampa (2015) ^a	0,0500	0,0000	0,0406	0,0682	0,0693	0,0646	0,0855
Wal-St-napis (2015) ^a	0,0565	0,0406	0,0000	0,0414	0,0728	0,0661	0,0704
Zaj-Las (2015) ^b	0,0676	0,0682	0,0414	0,0000	0,0573	0,0769	0,0512
Zaj-Las (2008) ^b	0,0167	0,0693	0,0728	0,0573	0,0000	0,0442	0,0347
Wal3 (2013) ^a	0,0436	0,0646	0,0661	0,0769	0,0442	0,0000	0,0349
Zaj-Las (2013) ^b	0,0603	0,0855	0,0704	0,0512	0,0347	0,0349	0,0000

TABELA 16. Dystans genetyczny Reynolds'a pomiędzy parami populacji dla roślin *G. robertianum* z torowych ^a i leśnych ^b populacji z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśnych populacji porównawczych ^c, obliczone na podstawie matrycy 1.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Francja (2013) ^c	KPN (2013) ^c	L-Zaj (2013) ^a	Zed-Las (2014) ^b	Zed (2014) ^a	W-S3C (2013) ^a	Grzyb-Las (2014) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	St-ZB (2014) ^a	BF (2013) ^a	B-Z-Las (2014) ^b	ZB (2013) ^a	ZB-Las (2014) ^b	Wal-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,1176	0,0841	0,1510	0,1889	0,1444	0,1564	0,1392	0,0473	0,1711	0,1071	0,1715	0,0850	0,0805	0,1836
Francja (2013) ^c	0,1176	0,0000	0,0759	0,1416	0,1744	0,1343	0,1498	0,2013	0,1411	0,2201	0,1235	0,2164	0,1227	0,1096	0,2032
KPN (2013) ^c	0,0841	0,0759	0,0000	0,0573	0,1242	0,0876	0,1216	0,1972	0,1040	0,2421	0,0942	0,1914	0,0736	0,0649	0,1945
L-Zaj (2013) ^a	0,1510	0,1416	0,0573	0,0000	0,1189	0,0906	0,0947	0,2621	0,1786	0,2948	0,1275	0,2387	0,1667	0,1450	0,2400
Zed-Las (2014) ^b	0,1889	0,1744	0,1242	0,1189	0,0000	0,0692	0,0975	0,2422	0,1992	0,2708	0,1369	0,2003	0,1934	0,1718	0,1581
Zed (2014) ^a	0,1444	0,1343	0,0876	0,0906	0,0692	0,0000	0,0555	0,1783	0,1456	0,2030	0,1100	0,2038	0,1356	0,1282	0,1785
W-S3C (2013) ^a	0,1564	0,1498	0,1216	0,0947	0,0975	0,0555	0,0000	0,2341	0,1545	0,2506	0,1019	0,1847	0,1384	0,1488	0,1673
Grzyb-Las (2014) ^b	0,1392	0,2013	0,1972	0,2621	0,2422	0,1783	0,2341	0,0000	0,1429	0,1382	0,1546	0,2208	0,1551	0,1176	0,1791
Zaj-Las (2008) ^b	0,0473	0,1411	0,1040	0,1786	0,1992	0,1456	0,1545	0,1429	0,0000	0,2041	0,0838	0,1235	0,0646	0,0548	0,1399
St-ZB (2014) ^a	0,1711	0,2201	0,2421	0,2948	0,2708	0,2030	0,2506	0,1382	0,2041	0,0000	0,1435	0,1765	0,1921	0,1627	0,1614
BF (2013) ^a	0,1071	0,1235	0,0942	0,1275	0,1369	0,1100	0,1019	0,1546	0,0838	0,1435	0,0000	0,0729	0,0306	0,0416	0,0681
B-Z-Las (2014) ^b	0,1715	0,2164	0,1914	0,2387	0,2003	0,2038	0,1847	0,2208	0,1235	0,1765	0,0729	0,0000	0,1009	0,0838	0,0479
ZB (2013) ^a	0,0850	0,1227	0,0736	0,1667	0,1934	0,1356	0,1384	0,1551	0,0646	0,1921	0,0306	0,1009	0,0000	0,0219	0,1098
ZB-Las (2014) ^b	0,0805	0,1096	0,0649	0,1450	0,1718	0,1282	0,1488	0,1176	0,0548	0,1627	0,0416	0,0838	0,0219	0,0000	0,1079
Wal-Las (2013) ^b	0,1836	0,2032	0,1945	0,2400	0,1581	0,1785	0,1673	0,1791	0,1399	0,1614	0,0681	0,0479	0,1098	0,1079	0,0000

TABELA 17. Dystans genetyczny Reynolds'a pomiędzy parami populacji dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Wali ^a i leśnych z Zajezierni ^b (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.), obliczone na podstawie matrycy 2.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Wal-St-rampa (2015) ^a	Wal-St-napis (2015) ^a	Zaj-Las (2015) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	Wal3 (2013) ^a	Zaj-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,2010	0,2169	0,2510	0,0473	0,1319	0,1669
Wal-St-rampa (2015) ^a	0,2010	0,0000	0,2273	0,3507	0,2454	0,2597	0,3090
Wal-St-napis (2015) ^a	0,2169	0,2273	0,0000	0,2233	0,2491	0,2580	0,2573
Zaj-Las (2015) ^b	0,2510	0,3507	0,2233	0,0000	0,2037	0,2910	0,1961
Zaj-Las (2008) ^b	0,0473	0,2454	0,2491	0,2037	0,0000	0,1238	0,0928
Wal3 (2013) ^a	0,1319	0,2597	0,2580	0,2910	0,1238	0,0000	0,1059
Zaj-Las (2013) ^b	0,1669	0,3090	0,2573	0,1961	0,0928	0,1059	0,0000

TABELA 18. Fst pomiędzy parami populacji dla roślin *G. robertianum* z torowych ^a i leśnych ^b populacji z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśnych populacji porównawczych ^c, obliczone na podstawie matrycy 1.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Francja (2013) ^c	KPN (2013) ^c	L-Zaj (2013) ^a	Zed-Las (2014) ^b	Zed (2014) ^a	W-S3C (2013) ^a	Grzyb-Las (2014) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	St-ZB (2014) ^a	BF (2013) ^a	B-Z-Las (2014) ^b	ZB (2013) ^a	ZB-Las (2014) ^b	Wal-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,1110	0,0806	0,1401	0,1721	0,1345	0,1448	0,1299	0,0462	0,1573	0,1015	0,1576	0,0815	0,0773	0,1677
Francja (2013) ^c	0,1110	0,0000	0,0731	0,1321	0,1601	0,1256	0,1391	0,1824	0,1316	0,1975	0,1162	0,1946	0,1155	0,1038	0,1838
KPN (2013) ^c	0,0806	0,0731	0,0000	0,0557	0,1168	0,0839	0,1145	0,1790	0,0988	0,2150	0,0899	0,1742	0,0710	0,0629	0,1767
L-Zaj (2013) ^a	0,1401	0,1321	0,0557	0,0000	0,1121	0,0866	0,0904	0,2306	0,1636	0,2553	0,1197	0,2123	0,1535	0,1350	0,2134
Zed-Las (2014) ^b	0,1721	0,1601	0,1168	0,1121	0,0000	0,0669	0,0929	0,2151	0,1806	0,2372	0,1279	0,1815	0,1759	0,1578	0,1462
Zed (2014) ^a	0,1345	0,1256	0,0839	0,0866	0,0669	0,0000	0,0540	0,1633	0,1355	0,1837	0,1041	0,1844	0,1268	0,1203	0,1635
W-S3C (2013) ^a	0,1448	0,1391	0,1145	0,0904	0,0929	0,0540	0,0000	0,2087	0,1432	0,2216	0,0969	0,1687	0,1292	0,1382	0,1540
Grzyb-Las (2014) ^b	0,1299	0,1824	0,1790	0,2306	0,2151	0,1633	0,2087	0,0000	0,1332	0,1291	0,1432	0,1981	0,1436	0,1109	0,1640
Zaj-Las (2008) ^b	0,0462	0,1316	0,0988	0,1636	0,1806	0,1355	0,1432	0,1332	0,0000	0,1846	0,0803	0,1162	0,0625	0,0534	0,1305
St-ZB (2014) ^a	0,1573	0,1975	0,2150	0,2553	0,2372	0,1837	0,2216	0,1291	0,1846	0,0000	0,1337	0,1618	0,1748	0,1501	0,1490
BF (2013) ^a	0,1015	0,1162	0,0899	0,1197	0,1279	0,1041	0,0969	0,1432	0,0803	0,1337	0,0000	0,0703	0,0302	0,0407	0,0658
B-Z-Las (2014) ^b	0,1576	0,1946	0,1742	0,2123	0,1815	0,1844	0,1687	0,1981	0,1162	0,1618	0,0703	0,0000	0,0960	0,0804	0,0468
ZB (2013) ^a	0,0815	0,1155	0,0710	0,1535	0,1759	0,1268	0,1292	0,1436	0,0625	0,1748	0,0302	0,0960	0,0000	0,0217	0,1040
ZB-Las (2014) ^b	0,0773	0,1038	0,0629	0,1350	0,1578	0,1203	0,1382	0,1109	0,0534	0,1501	0,0407	0,0804	0,0217	0,0000	0,1022
Wal-Las (2013) ^b	0,1677	0,1838	0,1767	0,2134	0,1462	0,1635	0,1540	0,1640	0,1305	0,1490	0,0658	0,0468	0,1040	0,1022	0,0000

TABELA 19. Fst pomiędzy parami populacji dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Walił ^a i leśnych z Zajezierec ^b (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.), obliczone na podstawie matrycy 2.

Populacja	Wal-St (2008) ^a	Wal-St-rampa (2015) ^a	Wal-St-napis (2015) ^a	Zaj-Las (2015) ^b	Zaj-Las (2008) ^b	Wal3 (2013) ^a	Zaj-Las (2013) ^b
Wal-St (2008) ^a	0,0000	0,1821	0,1950	0,2220	0,0462	0,1235	0,1537
Wal-St-rampa (2015) ^a	0,1821	0,0000	0,2033	0,2958	0,2176	0,2287	0,2658
Wal-St-napis (2015) ^a	0,1950	0,2033	0,0000	0,2002	0,2205	0,2274	0,2269
Zaj-Las (2015) ^b	0,2220	0,2958	0,2002	0,0000	0,1843	0,2525	0,1780
Zaj-Las (2008) ^b	0,0462	0,2176	0,2205	0,1843	0,0000	0,1164	0,0887
Wal3 (2013) ^a	0,1235	0,2287	0,2274	0,2525	0,1164	0,0000	0,1005
Zaj-Las (2013) ^b	0,1537	0,2658	0,2269	0,1780	0,0887	0,1005	0,0000

105

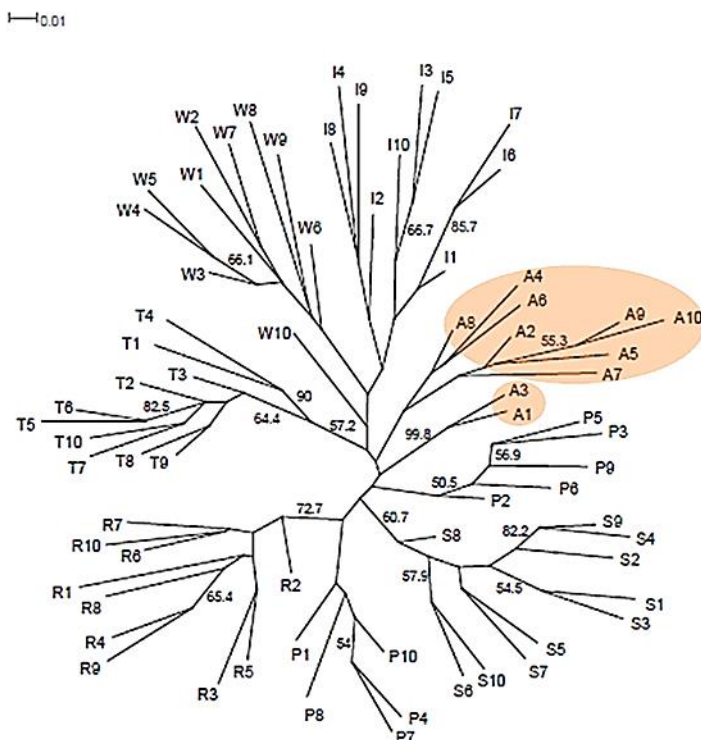


FIGURA 68. Konsensusowe, nieukorzenione drzewo z wartościami *bootstrap* (zaznaczono wartości >50%), utworzone metodą *Neighbor-Joining* (NJ). Drzewo zostało stworzone w programie SplitsTree w oparciu o pliki wyjściowe z programu FAMD na podstawie matrycy 2. Liczby przy symbolach populacji oznaczają numer kolejnego osobnika w każdej populacji. Symbole populacji: Zaj-Las (2008) [I], Zaj-Las (2013) [W], Zaj-Las (2015) [S], Wal-St (2008) [A] – oznaczona na pomarańczowo, Wal3 (2013) [T], Wal-St-napis (2015) [P], Wal-St-rampa (2015) [R].

W przypadku matrycy 1 na dendrogramie (FIG. 67) widać, że brak jest wyraźnej struktury genetycznej. Główne gałęzie drzewa mają współczynnik *bootstrap* niższy niż 50%. Na dendrogramie stworzonym w programie SplitsTree dla matrycy 2 (FIG. 68) także widać, że brak jest wyraźnej struktury genetycznej. Na dendrogramie widać kilka gałęzi, które mają współczynnik *bootstrap* wyższy niż 50%, jednak większość gałęzi ma współczynnik *bootstrap* niższy niż 50%.

Analizę struktury genetycznej populacji torowych i leśnych roślin *G. robertianum* przeprowadzono za pomocą programu STRUCTURE, w oparciu o kompletny zestaw danych, oddzielnie dla badanych matryc. Analizę struktury genetycznej wykonano za pomocą grupowania Bayesowskiego. Wyniki analizy struktury genetycznej badanych populacji torowych i leśnych roślin *G. robertianum* przedstawiono dla matrycy 1 na FIGURACH 69 i 70, a dla matrycy 2 na FIGURACH 71 i 72.

W przypadku matrycy 1 model struktury genetycznej zilustrowany jako wykres funkcji $\Delta K/K$ ujawnił, że istotnym poziomem badanej matrycy danych jest poziom $K=2$ (maksimum ΔK dla $K=2$). Dla poziomu $K=2$ wartość funkcji $\Delta K/K$ przyjmowała wartość znacząco różną od zera (FIG. 69). Przy poziomie $K=2$ w pierwszej grupie znalazły się głównie rośliny *G. robertianum* z populacji: Wal-St (2008), L-Zaj (2013), Zed-Las (2014), Zed (2014), W-S3C (2013) oraz

Francja (2013) i KPN (2013), natomiast w drugiej grupie rośliny z populacji: Grzyb-Las (2014), Zaj-Las (2008), St-ZB (2014), BF (2013), B-Z-Las (2014), ZB (2013), ZB-Las (2014) i Wal-Las (2013). Nie uzyskano jednak jasnej struktury genetycznej, na co wskazują niskie wartości ΔK . Nie zaobserwowano także żadnych charakterystycznych zależności (FIG. 70).

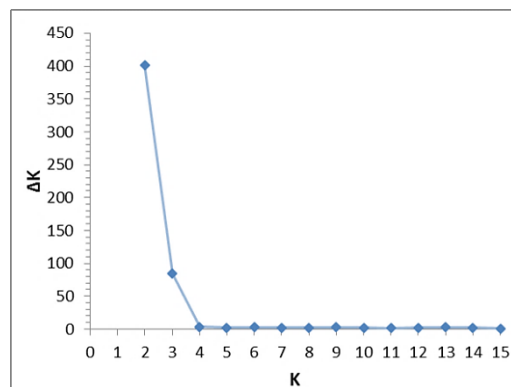


FIGURA 69. Wykres funkcji $\Delta K/K$ obliczonej na podstawie danych otrzymanych po wykonaniu analizy w programie STRUCTURE (grupowanie Bayesowskie), dla matrycy 1 (torowe i leśne populacje roślin *G. robertianum* z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśne populacje porównawcze (Francja, KPN)). Wykres wskazuje najbardziej prawdopodobną liczbę grup osobników: $K=2$ ($\Delta K \approx 400$).

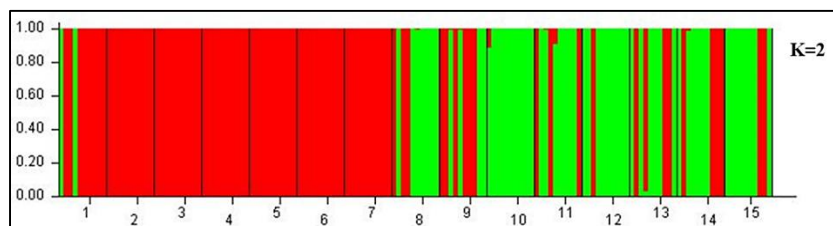


FIGURA 70. Model struktury genetycznej dla $K=2$, otrzymany po wykonaniu analizy w programie STRUCTURE (grupowanie Bayesowskie), dla matrycy 1. Symbole populacji: 1 [Wal-St (2008)], 2 [Francja (2013)], 3 [KPN (2013)], 4 [L-Zaj (2013)], 5 [Zed-Las (2014)], 6 [Zed (2014)], 7 [W-S3C (2013)], 8 [Grzyb-Las (2014)], 9 [Zaj-Las (2008)], 10 [St-ZB (2014)], 11 [BF (2013)], 12 [B-Z-Las (2014)], 13 [ZB (2013)], 14 [ZB-Las (2014)], 15 [Wal-Las (2013)].

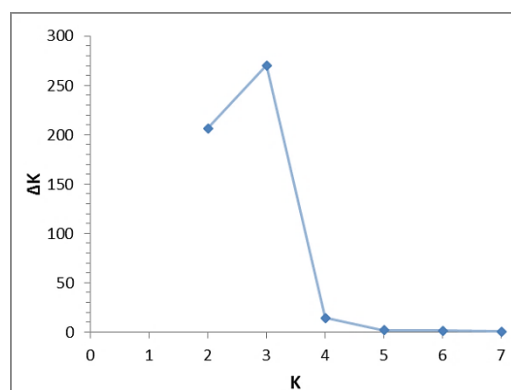


FIGURA 71. Wykres funkcji $\Delta K/K$ obliczonej na podstawie danych otrzymanych po wykonaniu analizy w programie STRUCTURE (grupowanie Bayesowskie), dla matrycy 2 (populacje torowe z Walit i leśne z Zajezierec roślin *G. robertianum* (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.)). Wykres wskazuje najbardziej prawdopodobną liczbę grup osobników: $K=3$ ($\Delta K > 250$).

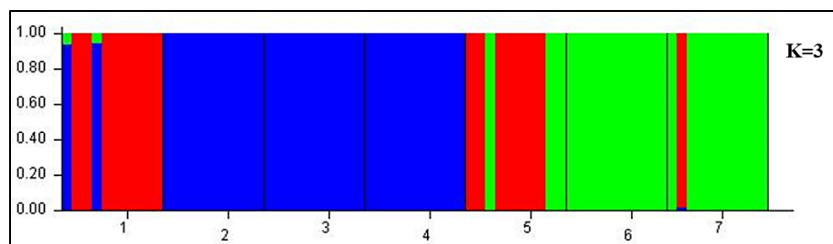


FIGURA 72. Model struktury genetycznej dla $K=3$, otrzymany po wykonaniu analizy w programie STRUCTURE (grupowanie Bayesowskie), dla matrycy 2. Symbole populacji: 1 [Wal-St (2008)], 2 [Wal-St-rampa (2015)], 3 [Wal-St-napis (2015)], 4 [Zaj-Las (2015)], 5 [Zaj-Las (2008)], 6 [Wal3 (2013)], 7 [Zaj-Las (2013)].

W przypadku matrycy 2 model struktury genetycznej zilustrowany jako wykres funkcji $\Delta K/K$ pokazał, że istotnym poziomem badanej matrycy danych jest poziom $K=3$ (maksimum ΔK dla $K=3$). Dla poziomu $K=3$ wartość funkcji $\Delta K/K$ przyjmowała wartość znacząco różną od zera (FIG. 71). Przy poziomie $K=3$ model struktury genetycznej pokazał, że badane populacje *G. robertianum* grupują się latami (populacje z 2008, 2013 i 2015 r.), a nie ze względu na pochodzenie – populacje torowe lub leśne (FIG. 72). Nie uzyskano jednak jasnej struktury genetycznej, na co wskazują niskie wartości ΔK .

IV.7.3. ANALIZA WARIANCJI MOLEKULARNEJ (AMOVA) BADANYCH POPULACJI

W ostatnim etapie badań wykonano molekularną analizę wariancji (AMOVA) w celu sprawdzenia rozkładu zmienności genetycznej wewnątrz i pomiędzy głównymi grupami populacji torowych i leśnych *G. robertianum*. Analizy AMOVA wykonano dla obu badanych matryc oddzielnie. Analizy wykonano w programie Arlequin. W badanych matrycach wykonano następujące analizy AMOVA:

- **Matryca 1** (15 populacji, 265 loci: torowe i leśne populacje z badanego obszaru oraz leśne populacje porównawcze):
 - analiza bez grupowania populacji (wariant: „wszystkie populacje”);
 - analiza dzieląca badane populacje na 4 grupy (wariant: „cztery grupy”): (1) populacje torowe pochodzące z linii nr 37, (2) leśną populację odniesienia z Francji, (3) leśną populację odniesienia z KPN, (4) populacje leśne pochodzące z okolic linii nr 37;
 - analiza dzieląca badane populacje na 3 grupy (wariant: „trzy grupy”): (1) populacje torowe i leśne pochodzące z linii nr 37 / okolic linii nr 37, (2) leśną populację odniesienia z Francji, (3) leśną populację odniesienia z KPN.
- **Matryca 2** (7 populacji, 265 loci: populacje torowe z Wali i leśne z Zajezierec, wyhodowane w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrane w terenie w 2013 i 2015 r.):
 - analiza bez grupowania populacji (wariant: „wszystkie populacje”);
 - analiza dzieląca badane populacje na 2 grupy (wariant: „dwie grupy”): (1) populacje torowe z Wali z kolejnych lat, (2) populacje leśne z Zajezierec z kolejnych lat;
 - analiza dzieląca badane populacje na 3 grupy (wariant: „trzy grupy”): (1) populacje torowe z Wali i leśne z Zajezierec podzielone na grupy wg lat 2008, 2013 i 2015.

Dla matrycy 1 w analizie AMOVA bez grupowania populacji *G. robertianum* (wariant: „wszystkie populacje”) wykazano, że 78,08% obserwowanej zmienności genetycznej było efektem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego a jedynie 21,92 % obserwowanej zmienności genetycznej było wynikiem zróżnicowania pomiędzy populacjami. Analiza AMOVA dla wariantu z czterema grupami (1. torowe, linia nr 37; 2. Francja; 3. KPN; 4. leśne, okolice linii nr 37) pokazała, że 77,92% obserwowanej zmienności genetycznej było wynikiem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego, 21,48% było wynikiem zróżnicowania pomiędzy populacjami wewnątrz grup, zaś jedynie 0,60% było wynikiem zróżnicowania pomiędzy grupami. Podobne zależności, jak w przypadku wariantu „cztery grupy” uzyskano dla wariantu „trzy grupy” (1. torowe i leśne, linia nr 37 i jej okolice; 2. Francja; 3. KPN) (TAB. 20).

TABELA 20. Analizy wariancji molekularnej (AMOVA) dla roślin *G. robertianum* z torowych i leśnych populacji z badanego obszaru (okolice linii kolejowej nr 37) oraz leśnych populacji porównawczych, wykonane na podstawie matrycy 1. W tabeli przedstawiono różne warianty analizy: „wszystkie populacje”, „cztery grupy” i „trzy grupy”.

Badana grupa	Źródło wariancji	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Składowe wariancji	Procent wariancji
Wszystkie populacje	Pomiędzy populacjami	14	1338,467	7,04944	21,92
	W obrębie populacji	135	3389,900	25,11037	78,08
	Razem	149	4728,367	32,15981	-
Cztery grupy: 1. torowe, linia nr 37; 2. Francja; 3. KPN; 4. leśne, okolice linii nr 37.	Pomiędzy populacjami	3	300,829	2,28100	7,00
	W obrębie populacji	146	4427,538	30,32560	93,00
	Razem	149	4728,367	32,60660	-
	Pomiędzy grupami	3	300,829	0,19387	0,60
	Pomiędzy populacjami wewnątrz grup	11	1037,638	6,92204	21,48
	W obrębie populacji	135	3389,900	25,11037	77,92
	Razem	149	4728,367	32,22628	-
Trzy grupy: 1. torowe i leśne, linia nr 37 i jej okolice; 2. Francja; 3. KPN.	Pomiędzy populacjami	2	189,313	3,54325	10,29
	W obrębie populacji	147	4539,054	30,87792	89,71
	Razem	149	4728,367	34,42117	-
	Pomiędzy grupami	2	189,313	-0,06147	-0,19
	Pomiędzy populacjami wewnątrz grup	12	1149,154	7,06525	22,00
	W obrębie populacji	135	3389,900	25,11037	78,19
	Razem	149	4728,367	32,11415	-

W przypadku matrycy 2 analiza AMOVA dla wariantu „wszystkie populacje” wykazała, że obserwowana zmienność genetyczna w 72,05% była efektem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego, zaś w 27,95% – zróżnicowania pomiędzy populacjami. W przypadku wariantu „dwie grupy” dzielącego populacje *G. robertianum* na torowe z Wali i leśne z Zajezierec, analiza AMOVA pokazała, że 70,59% obserwowanej zmienności genetycznej było wynikiem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego, 24,67% było wynikiem zróżnicowania pomiędzy populacjami wewnątrz grup, a 4,75% było wynikiem zróżnicowania pomiędzy grupami. W przypadku wariantu „trzy grupy”, gdzie podzielono populacje ze względu na lata, analiza AMOVA pokazała, że obserwowana zmienność genetyczna w 70,23% wynika ze zróżnicowania w obrębie populacji, w 19,13% wynika ze zróżnicowania pomiędzy populacjami wewnątrz grup, zaś w 10,64% ze zróżnicowania pomiędzy grupami (TAB. 21).

TABELA 21. Analizy wariancji molekularnej (AMOVA) dla roślin *G. robertianum* z populacji torowych z Walił i leśnych z Zajezierec (osobniki do badań wyhodowano w szklarni z nasion zebranych w 2008 r., lub zebrano w terenie w 2013 i 2015 r.), wykonane na podstawie matrycy 2. W tabeli przedstawiono różne warianty analizy: „wszystkie populacje”, „dwie grupy” i „trzy grupy”.

Badana grupa	Źródło wariancji	Liczba stopni swobody	Suma kwadratów	Składowe wariancji	Procent wariancji
Wszystkie populacje	Pomiędzy populacjami	6	694,343	9,20048	27,95
	W obrębie populacji	63	1494,300	23,71905	72,05
	Razem	69	2188,643	32,91952	-
Dwie grupy: 1. torowe z Walił z kolejnych lat, linia nr 37; 2. leśne z Zajezierec z kolejnych lat, okolice linii nr 37.	Pomiędzy populacjami	1	161,318	3,83554	11,40
	W obrębie populacji	68	2027,325	29,81360	88,60
	Razem	69	2188,643	33,64914	-
	Pomiędzy grupami	1	161,318	1,59579	4,75
	Pomiędzy populacjami wewnątrz grup	5	533,025	8,28860	24,67
	W obrębie populacji	63	1494,300	23,71905	70,59
	Razem	69	2188,643	33,60343	-
	Razem	69	2188,643	33,60343	-
Trzy grupy: 1. torowe z Walił i leśne z Zajezierec - 2008 r.; 2. torowe z Walił i leśne z Zajezierec - 2013 r.; 3. torowe z Walił i leśne z Zajezierec - 2015 r.	Pomiędzy populacjami	2	341,010	6,25311	18,48
	W obrębie populacji	67	1847,633	27,57662	81,52
	Razem	69	2188,643	33,82972	-
	Pomiędzy grupami	2	341,010	3,59500	10,64
	Pomiędzy populacjami wewnątrz grup	4	353,333	6,46143	19,13
	W obrębie populacji	63	1494,300	23,71905	70,23
	Razem	69	2188,643	33,77548	-
	Razem	69	2188,643	33,77548	-

IV.7.4. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* – PODSUMOWANIE

W ramach przeprowadzonych badań genetycznych nie wykazano, aby nowa forma *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym różniła się od roślin z innych populacji torowych i leśnych. Rangę taksonomiczną roślin z populacji torowej z Walił-Stacji należy określić jako „forma”. Nie wykazano także różnic genetycznych pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji torowych i roślinami z populacji leśnych. Podsumowanie wyników badań genetycznych przedstawiono poniżej:

- Wykazano niską różnorodność genetyczną w obrębie badanych populacji *G. robertianum*.
- Wartości dystansu genetycznego Nei, dystansu genetycznego wg Reynolds’a oraz współczynnik utrwalenia F_{ST} pomiędzy parami badanych populacji były bardzo niskie.
- Próby analizy struktury genetycznej badanych populacji *G. robertianum* metodą dendrogramu oraz w programie STRUCTURE nie przyniosły rezultatu w postaci uzyskania jasnej struktury genetycznej.
- Wyniki analizy AMOVA wskazują na brak silnej struktury genetycznej pomiędzy badanymi populacjami. Obserwowana zmienność genetyczna w badanych populacjach roślin *G. robertianum* była głównie efektem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego, zaś w znacznie mniejszym stopniu wynikiem zróżnicowania pomiędzy populacjami.

V. DYSKUSJA

W ramach niniejszej pracy przeprowadzono badania nad roślinami *Geranium robertianum* L. z „populacji torowych” i „populacji leśnych”. Głównym celem badań było sprawdzenie jaka jest ranga taksonomiczna nowo odkrytej formy (biotypu) gatunku *G. robertianum*, porastającej tory kolejowe w północno-wschodniej Polsce (miejscowość Walił-Stacja) i opisanej po raz pierwszy przez WIERZBICKĄ I IN. (2014). W ramach pracy rozważano, w jakim stopniu nowa forma *G. robertianum* jest powszechna na torach kolejowych w północno-wschodniej Polsce oraz, czy i jak bardzo się różni od innych populacji torowych i leśnych? Sprawdzone także, na czym polegają przystosowania roślin *G. robertianum* z populacji torowych do niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych, takich jak: insolacja, niedobór wody oraz stosowanie herbicydów? Na koniec zbadano, czy nowo odkryta forma *G. robertianum* z Walił-Stacji pod względem genetycznym istotnie różni się od roślin z innych populacji torowych i leśnych.

V.1. WARUNKI ŻYCIA A ZMIENNOŚĆ MORFOLOGICZNA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* NA STANOWISKACH TERENOWYCH

Z danych literaturowych wynika, że *G. robertianum* występuje powszechnie prawie na całym świecie. Gatunek ten występuje w biomach od śródziemnomorskich po borealne oraz przez oceaniczne po kontynentalne. Dane literaturowe pokazują także, że *G. robertianum* choć najczęściej występuje w lasach, w wilgotnych i zacienionych siedliskach to może także występować w suchych i odsłoniętych miejscach (AEDO 2000; FALINSKA, PIROZNIKOV 1983; GRIME I IN. 1988; NISHIDA I IN. 2012; SHISHKIN, BOBROV 1974; VANDELOOK I VAN ASSCHE 2010; TOFTS 2004). Również w pracy, WIERZBICKA I IN. (2014), gdzie badano zarówno torowe, jak i leśne populacje *G. robertianum*, wykazano, że gatunek ten występuje w bardzo różnorodnych siedliskach. W przypadku torów kolejowych rośliny *G. robertianum* występowały: zarówno na intensywnie eksploatowanych, jak i nieczynnych torach kolejowych, na torach kolejowych otoczonych lasami liściastymi i iglastymi oraz otoczonymi łąkami lub obszarami ruderalnymi, na obszarach o różnym zacienieniu, na obszarach intensywnie deptanych i niedeptanych, na obszarach, gdzie tłuczeń składał się z grubych frakcji lub drobnego żwiru, czy wreszcie na torach o różnym pokryciu przez inne gatunki roślin (od 10% do 90%). Obserwacje z badań terenowych wykonane w ramach niniejszej pracy zgadzają się w większości z danymi literaturowymi. Jednak warto podkreślić fakt, że nie obserwowano, aby rośliny *G. robertianum* występowały na obszarach kolejowych w całości otoczonych lasami iglastymi, czy też na torach porośniętych intensywnie trawami.

Badania terenowe wykazały, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych różnią się od roślin z populacji leśnych. Wykazano, że większość roślin z populacji torowych w stosunku do populacji leśnych była mniejsza – miała niższe i mniej rozłożyste rozety. Jednocześnie, w populacjach torowych w stosunku do leśnych występowały osobniki *G. robertianum* o niemal dwukrotnie większej liczbie liści w rozetach. W ramach badań terenowych wykazano także, że blaszki liściowe roślin *G. robertianum* z populacji torowych były mniejsze niż blaszki liściowe u roślin z populacji leśnych. Również w pracy WIERZBICKA I IN. (2014) wykazano, że rośliny *G. robertianum* występujące na torach były mniejsze niż rośliny występujące w lasach.

Kolejną cechą odróżniającą rośliny *G. robertianum* z populacji torowych od roślin z populacji leśnych było to, że w populacjach torowych pojawiało się wiele osobników o liściach czerwonych, podczas gdy w populacjach leśnych nie obserwowano takiego zabarwienia liści. Rośliny z populacji leśnych były intensywnie zielone. W ramach badań terenowych wykazano, że warunki siedliskowe panujące na torach kolejowych są zdecydowanie różne od tych, które występują w lasach. Istotnym czynnikiem różnicującym oba typy siedlisk było natężenie światła – zdecydowanie większe na torach kolejowych (8 razy wyższe). Wynik ten tłumaczy intensywnie czerwone zabarwienie liści roślin z populacji torowych. Jak wiadomo, podwyższony poziom antocyjanów, które dają liściom czerwone zabarwienie, chroni aparat fotosyntetyczny roślin przed insolacją (CHALKER-SCOTT 1999; STEYN I IN. 2002). W pracach BAKER (1956) i TOFTS (2004) gatunek *G. robertianum* jest dzielony na dwie odmiany, ze względu na występowanie w zacienionych lub nasłonecznionych miejscach. Odmiana występująca w zacienionych miejscach (var. *umbraticum* Westerlund) jest dość powszechna i charakteryzują ją szerokie segmenty liści, niska zawartość antocyjanów oraz raczej pionowy pokrój. Natomiast rośliny występujące w nasłonecznionych miejscach (var. *rubricaule*) mają często zaczerwienione liście i są zwykle karłowate. Także w pracy WIERZBICKA I IN. (2014) zaobserwowano, że rośliny *G. robertianum* występujące na torach kolejowych, gdzie występuje insolacja, miały intensywnie czerwone liście, podczas gdy rośliny występujące w lasach były zielone.

W pracy RODWELL (1991) i TOFTS (2004) pokazano, że na skalistych glebach *G. robertianum* często wykazuje wyraźne zaczerwienienie, które wskazuje na niedobór fosforu lub azotu. Z kolei, badania BURIÁNEK I IN. (2013) pokazują, że jest to gatunek nitrofilny. Jednak przyczyną wystąpienia zaczerwienienia liści u roślin z torowych populacji nie mógł być niedobór tych składników, ponieważ w pracach GALERA I IN. (2011) oraz WIERZBICKA I IN. (2014) pokazano, że podłoże z nasypów kolejowych zawiera podwyższone ilości azotu i fosforu (w tym również przyswajalnego) w stosunku do obszarów kontrolnych.

Uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej wyniki z badań terenowych, jak również dane literaturowe pokazują, że mniejsze rozmiary roślin *G. robertianum*, przy jednocześnie większej liczbie małych, intensywnie czerwonych liści w rozetach mogą stanowić przystosowanie tych roślin do silnego nasłonecznienia. W kolejnych rozdziałach przeanalizowano wyniki badań morfologicznych roślin hodowanych w jednakowych warunkach w szklarni. Badania te miały dać odpowiedź na pytanie, czy zróżnicowanie fenotypowe roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych było wynikiem jedynie różnych warunków siedliskowych panujących na torach kolejowych i w lasach, czy też obserwowane różnice są na tyle utrwalone, że występują także różnice w następnym pokoleniu roślin *G. robertianum*, przy jednakowych warunkach siedliskowych?

V.2. ZMIENNOŚĆ MORFOLOGICZNA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH HODOWANYCH W JEDNAKOWYCH WARUNKACH

V.2.1. KIELKOWANIE NASION

Z danych literaturowych wiadomo, że u wielu gatunków roślin tylko nieliczne dojrzałe nasiona są zdolne do kiełkowania natychmiast po oddzieleniu się od rośliny macierzystej.

Znacząca większość nasion przechodzi w stan spoczynku. Dla większości gatunków podstawową przyczyną spoczynku nasion jest zmniejszenie zawartości wody sięgające poniżej 10% s.m., zachodzące podczas ostatnich etapów dojrzewania. Spoczynek względny, spowodowany niewystarczającym uwodnieniem, ustępuje podczas imbibicji nasienia (pęcznienie nasion w wilgotnym środowisku). Dojrzałe nasiona wykazują także inne rodzaje spoczynku, np. fizjologiczny. Spoczynek względny jest powodowany niesprzyjającymi warunkami środowiska, takimi jak niekorzystna temperatura kiełkowania i oświetlenie. Spoczynek ten ustępuje natychmiast po ustąpieniu niesprzyjających warunków. Spoczynek nasion może być także spowodowany ich właściwościami strukturalnymi, np. obecnością łupiny nieprzepuszczalnej dla wody i gazów. Twarda łupina może także stanowić mechaniczną przeszkodę dla wzrostu. Dla nasion twardych warunkiem ustąpienia spoczynku jest uszkodzenie łupiny, np. w wyniku działania mikroflory glebowej. Do strukturalnych przyczyn spoczynku nasion można także zaliczyć niedojrzałość morfologiczną zarodka (tzw. głęboki spoczynek). U wielu gatunków roślin, podczas dojrzewania nasion odwodnienie i zapadnięcie w spoczynek następuje, zanim zakończy się formowanie zarodka. Po oddzieleniu się od rośliny macierzystej, a przed rozpoczęciem kiełkowania, takie nasiona muszą zakończyć fazę dojrzewania. Odbywa się to najczęściej w warunkach pełnej imbibicji i w temperaturze umożliwiającej wzrost (ciepła stratyfikacja). Zdolność nasion do zapadania w spoczynek jest cechą wykształconą w toku ewolucji i umożliwia przetrwanie gatunku w niesprzyjających warunkach środowiska (LEWAK 2002).

W pracy VANDELOOK I VAN ASSCHE (2010) – podobnie, jak w niniejszej pracy – badano kiełkowanie roślin *G. robertianum*. Wykazano tam, że większość nasion *G. robertianum*, które trafiają do gleby w nasłonecznionych miejscach kiełkuje latem, natychmiast po utracie fizycznego spoczynku (tzw. spoczynek względny czyli, stan w którym nasiona osiągnęły dojrzałość morfologiczną i fizjologiczną, ale kiełkowanie powstrzymują niekorzystne warunki zewnętrzne). Część nasion, które trafiły do gleby w zacienionych miejscach też traci fizyczny spoczynek głównie w okresie letnim, ale pozostają one fizjologicznie uśpione i kiełkują dopiero pod koniec zimy lub wczesną wiosną. Fizjologiczny spoczynek nasion (tzw. spoczynek bezwzględny, kiedy nasiona mogą posiadać dojrzałość morfologiczną lecz nie uzyskały jeszcze gotowości fizjologicznej do kiełkowania) zmniejsza się w zimie po schłodzeniu, umożliwiając w ten sposób kiełkowanie nasion w niskich temperaturach. Złożony system spoczynku fizycznego i fizjologicznego nasion zapewnia, że nasiona *G. robertianum* kiełkują latem na eksponowanych miejscach i wczesną wiosną w zacienionych miejscach (VANDELOOK I VAN ASSCHE 2010).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej pokazały, że im krótszy czas między zebraniem nasion a ich wysianiem, tym nasiona słabiej kiełkują. Oznacza to, że nasiona wymagają kilkumiesięcznego okresu spoczynku. Wynik ten jest zgodny z wynikami przedstawionymi w pracy VANDELOOK I VAN ASSCHE (2010). Badania morfologiczne pokazały, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych kiełkują lepiej niż rośliny z populacji leśnych. Także i ten wynik jest zgodny z badaniami VANDELOOK I VAN ASSCHE (2010). Zjawisko to można wyjaśnić tym, że torowe populacje *G. robertianum* występują na nasłonecznionych miejscach – zatem w sprzyjających warunkach do utraty fizycznego spoczynku nasion. Umożliwia to roślinom z populacji torowych szybsze kiełkowanie nasion.

Natomiast rośliny z populacji leśnych występują w zacienionych miejscach, przez co pozostają fizjologicznie uśpione i kiełkują w późniejszym okresie. Wynik ten można uznać za swoiste przystosowanie roślin *G. robertianum* do szybszego kiełkowania w miejscach nasłonecznionych, takich jak tory kolejowe. W ramach niniejszej pracy doktorskiej najlepiej kiełkowały nasiona roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) – zatem rośliny z tej populacji były najlepiej dostosowane do szybkiego kiełkowania nasion.

Nowym wynikiem uzyskanym w ramach niniejszej pracy było wykazanie, że nasiona pochodzące od roślin z populacji torowych zachowują dłużej wysoką zdolność kiełkowania (o kilka lat) niż nasiona pochodzące od roślin z populacji leśnych. W przypadku torowej populacji z Walił po 7 latach od zebrania nasion procent wykiełkowanych nasion wynosił ponad 60%, zaś dla nasion z populacji leśnej Zajezerce dochodził zaledwie do 20%. Dla porównania kiełkowanie nasion *G. robertianum* badano przez pięć lat w pracy ROBERTS I BODDRELL (1985). W ramach tych badań pokazano, że początkowa zdolność kiełkowania nasion *G. robertianum* wynosiła 0-2,1%, a następnie 42,6-43,5% (rok I), 1,5-6,3% (rok II), 0,5-0,8% (rok III), 0-0,8% (rok IV) i 0-0,1% (rok V) (ROBERTS, BODDRELL 1985). Obserwowane różnice w sile kiełkowania nasion *G. robertianum*, w stosunku do wyników niniejszej pracy doktorskiej mogą wynikać z tego, że w pracy ROBERTS I BODDRELL (1985) do badań wykorzystano populacje naturalne a nie torowe, zaś testy kiełkowania prowadzono na zewnątrz a nie w warunkach laboratoryjnych.

Spoczynek nasion wielu dzikich roślin, który trwa przez wiele lat może, np. utrudniać zwalczanie chwastów w uprawach (LEWAK 2002). A zatem, długie zachowanie wysokiej zdolności kiełkowania nasion roślin *G. robertianum* z populacji torowych jest szczególnym przystosowaniem do niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych, takich jak brak wody, czy oprysk herbicydami. Przystosowanie to zapewnia roślinom *G. robertianum* z populacji torowych sukces reprodukcyjny.

V.2.2. PARAMETRY BIOMETRYCZNE

Dane literaturowe pokazują, że chociaż rośliny *G. robertianum* w populacjach są często względnie jednolite, to mogą jednak występować wyraźne różnice między roślinami z różnych populacji. Pewna zmienność jest wywołana przez środowisko, chociaż niektóre taksonomicznie ważne zmienności mogą być określone genetycznie, np. stopień pokrycia roślin włoskami (BAKER 1956; TOFTS 2004).

Głównym wynikiem badań morfologicznych było wykazanie, że populacja torowa z Walił wyhodowana z nasion zebranych 2008 r., w oparciu o badane parametry biometryczne (liczba liści, długość ogonków liściowych, wysokość roślin, wielkość liści), różni się od innych populacji torowych i leśnych. Wykazano, że odmienna forma roślin *G. robertianum* występowała tylko w Waliłach. Nie była to charakterystyczna forma dla pozostałych populacji torowych. Rośliny z populacji Wal-St (2008) były mniejsze i miały dużo mniejsze blaszki liściowe niż rośliny z innych populacji. W ramach przeprowadzonych badań nie obserwowano znaczących różnic w obrębie pozostałych populacji torowych i leśnych. Nie wykazano, aby pod względem badanych cech morfologicznych populacje z torów i lasów stanowiły odrębne grupy, jak to miało miejsce w przypadku populacji badanych w terenie.

Podejrzewano, że obserwowane w terenie różnice pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi *G. robertianum*, podczas hodowli w jednakowych warunkach zanikają. Powyższe wyniki mogą świadczyć o dużej plastyczności fenotypowej gatunku *G. robertianum*.

W pracy TOFTS (2004) opisano niepublikowane wcześniej badania BOARD (2001), w ramach których na *G. robertianum* przeprowadzono eksperyment ogrodowy w południowej Brytanii. Wykazano istotnie ($p < 0,01$) niższą suchą biomasę dla roślin uprawianych w pełnym świetle przez okres 13 tygodni (2,02 g), w porównaniu z roślinami *G. robertianum* hodowanymi w miejscach częściowo zacienionych – 25% światła otoczenia (2,50 g). Jednakże, kiedy rośliny rosły w miejscach zacienionych – 12,5% światła otoczenia, to obserwowane różnice w suchej biomasie roślin były nieistotnie niższe (2,21 g). W pracy tej (BOARD 2001) wykazano także, że w miejscach słonecznych i częściowo zacienionych średnia liczba liści w rozetach *G. robertianum* wyniosła średnio powyżej 30 liści w rozetach, zaś w miejscach mocno zacienionych średnio około 27 liści. Wyniki te były jednak nieistotne statystycznie. Wyniki powyższych badań, podobnie jak wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej, świadczą o dużej plastyczności fenotypowej gatunku *G. robertianum*.

W ramach kolejnego etapu badań sprawdzano, czy na przestrzeni kilku lat, po zakończeniu użytkowania linii kolejowej nr 37, możliwe były zmiany wyglądu roślin z populacji torowej z miejscowości Waliły-Stacja. W ramach badań zaobserwowano, że w przypadku populacji z Walił wyhodowanych z nasion zebranych w latach 2008, 2013-2015, jedynie rośliny z populacji Wal-St (2008) różniły się od innych populacji z Walił. Dane uzyskane z badań morfologicznych roślin *G. robertianum* pokazały, że na przestrzeni kilku lat możliwe były zmiany w populacji z Walił. Wykazano że, charakterystyczne cechy obserwowane u roślin z populacji Wal-St (2008) zanikły w ciągu kilku lat. Zatem odmienna forma roślin z Walił nie była trwała. Prawdopodobnie na skutek zaniku, któregoś z czynników stresowych (zmniejszone użytkowanie linii kolejowej, brak oprysków herbicydem) charakterystyczne cechy obserwowane u roślin z populacji Wal-St (2008) zanikły na przestrzeni około 5 lat. W dalszej części pracy podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, jakie były najważniejsze czynniki selekcyjne, które pozwoliły na powstanie odrębnej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach-Stacji.

V.2.3. KOLOR BLASZEK LIŚCIOWYCH I ZAWARTOŚĆ ANTOCYJANÓW

Najlepszym parametrem do rozróżnienia populacji torowych i leśnych, oraz wyróżnienia populacji Wal-St (2008) w porównaniu z innymi populacjami, okazała się ocena koloru blaszek liściowych i zawartości antocyjanów w liściach. Antocyjany, które zalicza się do grupy flawonoidów są barwnikami roślinnymi, spokrewnionymi biogenetycznie i chemicznie z flawonami, leukoantocyjanidynami i katechinami. Antocyjany występują zazwyczaj w postaci glikozydów, które są nazywane antocyjaninami (antocyjanozydami) a ich aglikony antocyjanidynami. Antocyjany w roślinach występują w postaci soli flawyliowych. Barwniki antocyjanowe rozpuszczają się w soku komórkowym, nadając kwiatom, owocom, liściom charakterystyczne zabarwienie (KLIMEK 2011). Przyczyną czerwonego zabarwienia liści roślin *G. robertianum* z populacji torowych, wykazane zarówno

w trakcie badań trenowych, jak i hodowli roślin w jednakowych warunkach środowiskowych, przy jednakowym oświetleniu, była właśnie podwyższona zawartość antocyjanów w liściach.

W ramach niniejszej pracy posłużono się dwoma metodami badania zawartości antocyjanów. Zarówno w przypadku zastosowania metody opisywanej przez MANCINELLI I IN. (1988) oraz BIEZA, LOIS (2001), zgodnie z którą wykonano większość badań, jak i metody wykorzystanej tylko w badaniach wstępnych – FULEKI, FRANCIS (1968), do ekstrakcji antocyjanów z materiału roślinnego wykorzystano zakwaszony metanol. Antocyjany można wyekstrahować wodą lub polarnymi rozpuszczalnikami organicznymi. Często stosuje się ekstrakcję zakwaszonym metanolem (KLIMEK 2011). Zatem obie metody wykorzystane w badaniach nad zawartością antocyjanów w liściach roślin *G. robertianum* były odpowiednie.

We wszystkich przeprowadzonych doświadczeniach wyższą zawartość antocyjanów, zarówno w blaszkach liściowych, jak i ogonkach liściowych, obserwowano w liściach roślin z populacji torowych, a najniższą u roślin z populacji leśnych. Najwyższy poziom antocyjanów obserwowano zawsze w liściach roślin z populacji torowej Wal-St (2008). Także wizualnie rośliny *G. robertianum* z populacji Wal-St (2008) miały najciemniejsze liście spośród roślin ze wszystkich badanych populacji. Podwyższony poziom antocyjanów w roślinach chroni aparat fotosyntetyczny roślin przed insolacją (CHALKER-SCOTT 1999; STEYN I IN. 2002). Zatem różnice pomiędzy populacjami torowymi i leśnymi w poziomie zawartości antocyjanów w liściach *G. robertianum* mogą być związane z przystosowaniem populacji torowych *G. robertianum* do nadmiernej ilości światła. Przy, czym najlepiej dostosowane do insolacji były rośliny z populacji Wal-St (2008), ponieważ zawierały najwięcej antocyjanów w liściach. Stres radiacyjny mógł być jednym z czynników selekcyjnych, który przyczynił się do powstania nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Walilach-Stacji.

V.3. CZYNNIKI STRESOWE DLA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Terminem czynnik stresowy lub stresor określa się wszystkie czynniki środowiska, których oddziaływanie na organizm może doprowadzić do zaburzeń funkcji i struktury niekorzystnych dla roślin, mogą to być zarówno czynniki abiotyczne (np. nadmierne promieniowanie UV, czy niedobór wody), jak i biotyczne (np. stosowanie pestycydów). Zaburzenia spowodowane działaniem stresora, początkowo mogą być odwracalne. Jeśli jednak, czynnik stresowy działa z dużą intensywnością lub zbyt długo to z czasem obserwowane zaburzenia stają się nieodwracalne. Są one przyczyną zahamowania wzrostu i rozwoju roślin. Ponadto mogą spowodować trwałe uszkodzenie komórek, tkanek i organów, a nawet doprowadzić do śmierci osobnika. Działanie czynników stresowych może eliminować nawet całe populacje. Możliwość egzystencji roślin w danym siedlisku, powodzenie ich rozwoju osobniczego i wydanie potomstwa, zależy od tego, w jakim stopniu gatunek dostosowany jest do funkcjonowania w konkretnym środowisku. Istotne jest to, w jakim stopniu dany gatunek wykazuje odporność na występujące w środowisku stresory (KACPERSKA 2002; KOPCEWICZ 2012).

W pracy WIERZBICKA I IN. (2014)., wśród czynników stresowych, na które narażone są rośliny *G. robertianum* wymieniono insolację, niedobór wody i soli mineralnych, oprysk herbicydami oraz zanieczyszczenia typowe dla transportu kolejowego takie, jak metale ciężkie, WWA i PCB. W niniejszym rozdziale przeanalizowano wpływ na rośliny *G. robertianum* takich czynników stresowych, jak nadmierne promieniowanie UV, susza i oprysk herbicydem Roundup.

O odporności rośliny na dany stres decydują: właściwości organizmu (podatność / wrażliwość oraz odporność / wytrzymałość na stres), zdolność organizmu do naprawy uszkodzeń i wreszcie zdolności dostosowawcze organizmu, które mogą zachodzić na drodze adaptacji lub aklimatyzacji. Adaptacja jest skutkiem zmian zachodzących w genomie osobnika w toku ewolucji i polega na dziedzicznych zmianach struktury i funkcji, które zwiększają prawdopodobieństwo przeżycia i reprodukcji organizmu w określonym środowisku. Adaptacja jest trwała i prowadzi do zróżnicowania roślin pod względem morfologicznym i metabolicznym. Aklimatyzacja, z kolei polega na nieodziedziczalnej modyfikacji struktury i funkcji osobnika podczas jego rozwoju osobniczego, w odpowiedzi na czynnik stresowy działający w natężeniu subletalnym. Aklimatyzacja pozwala na zminimalizowanie uszkodzeń i lepsze dopasowanie osobnika do aktualnie panujących warunków środowiskowych. Polega ona zatem na zmianie aktualnie realizowanego programu genetycznego, indukowanej przez czynnik stresowy. Możliwości aklimatyzacyjne osobnika zależą od jego potencjału genetycznego (KACPERSKA 2002; KOPCEWICZ 2012).

V.3.1. WPŁYW STRESU RADIACYJNEGO NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Nadmiar promieniowania fotosyntetycznie czynnego lub zwiększona absorpcja promieniowania w zakresie nadfioletu (UV) wywołują stres radiacyjny (KACPERSKA 2002). W ramach niniejszej pracy wykazano, że natężenia światła na stanowiskach torowych było 8 razy wyższe niż na stanowiskach leśnych, gdzie występowały rośliny *G. robertianum*. Wynik ten potwierdza, że rośliny *G. robertianum* występujące na torach kolejowych są bardziej narażone na stres radiacyjny, niż rośliny występujące w lasach. Zatem stres radiacyjny mógł być jednym z czynników selekcyjnych, które mogły doprowadzić do wytworzenia się nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Wałach-Stacji.

W silnym świetle widzialnym (promieniowanie fotosyntetycznie czynne) liść otrzymuje więcej energii fotochemicznej niż zdolny jest spożytkować w procesie fotosyntezy. Nadmiar energii powoduje fotoinhibicję – zmniejsza kwantową wydajność fotosyntezy. Skrajnie duże naświetlenie powoduje z kolei fotodestrukcję barwników i struktury tylakoidów, szczególnie w chloroplastach miękiszu palisadowego. Prowadzi to do obniżenia intensywności fotosyntezy, głównie w starzejących się liściach. Rośliny fotolabilne już po krótkiej ekspozycji na światło ulegają uszkodzeniu. Natomiast rośliny fotostabilne są przystosowane do działania silnego światła. Może u nich jednak wystąpić fotoinhibicja i fotodestrukcja, jeśli wystąpią utrudnienia na drodze fotosyntetycznego transportu elektronów. Tego typu utrudnienia powstają na skutek wcześniej lub równolegle działających czynników stresowych, takich jak np. wysoka lub niska temperatura, susza, złe zaopatrzenie w związki mineralne, czy ekspozycja na działanie substancji toksycznych (KACPERSKA 2002).

Jeżeli chodzi o promieniowanie UV, to jego większa część przenikająca do komórek zostaje w nich zaabsorbowana i jest przyczyną silnych uszkodzeń. Długofalowe promieniowanie UV (tzw. UV-A o długości fali 315-400 nm) powoduje głównie efekty fotooksydacyjne, a promieniowanie UV-B (o długości fali 280-315 nm) powoduje ponadto uszkodzenia błon. Objawami uszkodzeń spowodowanych promieniowaniem UV są m.in. zmiany aktywności enzymatycznej, zmniejszenie ładunku energii, zahamowanie krążenia cytoplazmy, zmniejszenie wydajności fotosyntezy, czy wreszcie zahamowanie wzrostu elongacyjnego (CHALKER-SCOTT 1999; KACPERSKA 2002; STEYN I IN. 2002).

Adaptacja roślin do warunków silnego napromieniania światłem fotosyntetycznie czynnym polega na wykształceniu zdolności do unikania szkodliwego działania takiego światła, np. poprzez zmianę kąta ustawienia blaszek liściowych, tak aby padało na nie mniej światła, zwijanie części nadziemnej, ruchy chloroplastów w tkance asymilującej. Unikanie szkodliwego działania światła może także polegać na wytworzeniu gęstych włosków na górnej powierzchni liścia lub na pogrubieniu ścian komórkowych epidermy i tkanek pod epidermą, co powoduje rozproszenie światła i osłabia efekt silnej radiacji (KACPERSKA 2002). Zatem, silne pokrycie liści *G. robertianum* włoskami gruczołowymi (PEDRO I IN. 1990) może stanowić pewną ochronę liści przed stresem radiacyjnym.

W pracy WIERZBICKA I IN. (2014) badano fluorescencję chlorofilu a u roślin *G. robertianum* z populacji torowej z Walił i leśnej z Zajezierec narażonych na stres świetlny. Wykazano wyższą odporność na stres świetlny roślin *G. robertianum* z populacji torowej w porównaniu do roślin z populacji leśnej. Pomiar niektórych parametrów fluorescencji chlorofilu jest obecnie jedną z podstawowych metod oceny intensywności reakcji roślin na stres świetlny, deficyt wody lub inne stresy (KACPERSKA 2002).

Jedną z metod ochrony roślin przed stresem radiacyjnym jest synteza i nagromadzenie antocyjanin w komórkach liści, głównie w epidermie, co umożliwia pochłonięcie części energii świetlnej i ochronę aparatu asymilacyjnego. Może także wystąpić zwiększenie zawartości barwników ochronnych, takich jak karoteny i luteina w chloroplastach (KACPERSKA 2002). Z kolei ochrona komórek roślinnych przed promieniowaniem UV polega na wydajnej absorpcji tego promieniowania przez woski na powierzchni kutikuli oraz tianiny i flawonoidy (np. antocyjany) rozpuszczone w soku w wakuoli. Pod wpływem tego stresu może zachodzić w komórkach wzmożona synteza i gromadzenie barwników pochłaniających UV (KACPERSKA 2002; SOLECKA 1997; STEYN I IN. 2002).

W ramach niniejszych badań wykazano, że wyższą zawartość antocyjanów, zarówno w blaszkach liściowych, jak i ogonkach liściowych miały rośliny z populacji torowych, niż leśnych. Najwyższy poziom antocyjanów obserwowano zawsze w liściach roślin z populacji torowej Wal-St (2008). Potwierdzono, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych, w szczególności z populacji torowej z Walił, charakteryzuje zwiększona odporność na stres świetlny w porównaniu do roślin z populacji leśnych, ponieważ podwyższony poziom antocyjanów w roślinach chroni aparat fotosyntetyczny roślin przed insolacją (CHALKER-SCOTT 1999; STEYN I IN. 2002). Jest to adaptacja do warunków insolacji panujących na torach kolejowych. Wynik ten jest zgodny z badaniami WIERZBICKIEJ I IN. (2014), dotyczącymi podwyższonej tolerancji na wysokie natężenie światła roślin z Walił.

V.3.2. WPŁYW SUSZY NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Wiele roślin ma zdolność do aklimatyzacji do warunków deficytu wody w środowisku, jeśli w trakcie wzrostu zostaną narażone na umiarkowany stres wodny trwający przez kilka dni (KACPERSKA 2002). Jak wiadomo na torach kolejowych często występują warunki niedoboru wody dla roślin (GALERA I IN. 2011, 2012; WIERZBICKA I IN. 2014). Mógł być to zatem kolejny czynnik selekcyjny, który przyczynił się do wyodrębnienia się nowej formy *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach.

Zdolność roślin do przetrwania okresów niedoboru wody określa się terminem odporności na suszę. Prawie każdy proces przebiegający w komórkach roślinnych ulega zmianom pod wpływem deficytu wody. Podłożem reakcji roślin na stres wodny mogą być następujące zjawiska: redukcja potencjału wody i zmniejszenie aktywności wody komórkowej; zwiększenie stężenia związków mało- i wielkocząsteczkowych w wyniku zmniejszenia się objętości komórek po utracie turgoru, zwiększenie stężenia soli i jonów; obniżenie ciśnienia turgorowego; zmiana stosunków przestrzennych między plazmolemmą, tonoplastem i błonami organelli w wyniku zmiany objętości komórki oraz zmiana oddziaływań między ścianą a plazmolemmą; zmiana struktury i konformacji makromolekuł pod wpływem usunięcia wody hydratacyjnej lub w wyniku modyfikacji oddziaływań pozostałych cząsteczek wody z makromolekułami. O tym, który z tych mechanizmów zadziała decyduje natężenie stresu. Jeśli tkanka roślinna utraci więcej niż 50% względnej zawartości wody, uważa się, że uległa ona desykcacji (KACPERSKA 2002; Kopcewicz 2012).

W ramach badań wykazano, że do warunków suszy lepiej dostosowane były rośliny z populacji torowych, w szczególności roślina z populacji Wal-St (2008), na których po 26 dniach suszy nadal obserwowano wyrastanie nowych liści. Również nasilenie innych zmian takich jak chlorozy, nekrozy, czy zaczerwienienie liści było najniższe na liściach rośliny z populacji torowej Wal-St (2008). Z kolei, roślina z populacji leśnej Zaj-Las (2014) gorzej reagowała na warunki suszy niż rośliny z populacji torowych. Najbardziej wrażliwy na niedobór wody jest wzrost komórek. Hamowanie wzrostu należy do najszybszych odpowiedzi komórek na niewielkie deficyty wody. Zahamowanie wzrostu komórek liścia jest jedną z wcześniejszych reakcji na stres wodny. Stres taki, ograniczając przyrost pędów i gałęzi, prowadzi też do zmniejszenia ogólnej liczby liści na roślinie (KACPERSKA 2002; KOPCEWICZ 2012). Fakt, że aż do końca trwania eksperymentu u roślin *G. robertianum* z populacji torowych, w szczególności w populacji Wal-St (2008), obserwowano wyrastanie nowych liści świadczy o zdecydowanie wyższej tolerancji na stres wodny, niż u rośliny z populacji leśnej, gdzie najmłodsze liście przestały się pojawiać po niecałym tygodniu trwania suszy. Długotrwały, nasilający się deficyt wody w środowisku może również spowodować przyspieszone starzenie i zrzucanie liści, co umożliwia redukcję powierzchni transpiracyjnej (KACPERSKA 2002). Usychanie liści szybciej nastąpiło u rośliny z populacji leśnej, zaś słabiej widoczne było u roślin z populacji torowych, w szczególności z populacji Wal-St (2008).

Rośliny w warunkach suszy, które wykazują deficyt wody w tkankach, ograniczają intensywność fotosyntezy później niż wzrost komórek. Hamowanie fotosyntezy jest tylko częściowo spowodowane przymknięciem aparatów szparkowych. W warunkach deficytu wody drogi włączania węgla ulegają modyfikacjom, m.in.: maleje aktywność karboksylazy

RuBP (rubisco) i ulega zahamowaniu włączanie węgla do cukrów. W warunkach słabego lub umiarkowanego stresu wodnego, który powoduje zamknięcie szparek liścia, w chloroplastach nie ustaje absorpcja energii świetlnej, funkcjonują oba fotoukłady i przenośniki elektronów, odbywa się synteza ATP i NADPH⁺. W warunkach silnego oświetlenia może natomiast dochodzić do zaburzeń funkcjonowania fotoukładów, głównie fotoukładu II (KACPERSKA 2002; KOPCEWICZ 2012). Warto zauważyć, że stres osmotyczny także może powodować zwiększoną produkcję antocyjanów (CHALKER-SCOTT 1999). Dostosowanie osmotyczne odgrywa kluczową rolę w aklimatyzacji roślin do suszy i zasolenia (KACPERSKA 2002; KOPCEWICZ 2012). We wszystkich populacjach, na roślinach *G. robertianum* między 5 a 12 dniem suszy obserwowano wystąpienie zaczerwienienia wierzchu blaszki liściowej na starszych liściach. Najmniej liści, na których wystąpiło zaczerwienienie blaszek liściowych zaobserwowano na roślinie z populacji torowej Wal-St (2008). Największy procent liści z zaczerwienioną blaszką liściową obserwowano na roślinie z populacji leśnej Zaj-Las (2014). Wynik ten może wskazywać, na to że rośliny *G. robertianum* „starają się” chronić aparat fotosyntetyczny wytwarzając antocyjany. Przy, czym wydaje się, że największe uszkodzenia fotoukładu mogły wystąpić u rośliny z populacji leśnej, u której obserwowano największy procent zaczerwienionych liści. Natomiast w przypadku roślin w populacji torowych, które od początku miały podwyższony poziom antocyjanów nie obserwowano gwałtownego zaczerwienienia liści na skutek suszy. Jak wiadomo podwyższony poziom antocyjanów w roślinach chroni aparat fotosyntetyczny roślin, jest to także jedna z reakcji na niedobór wody (CHALKER-SCOTT 1999; SOLECKA 1997; STEYN I IN. 2002). Zatem zwiększona zawartość antocyjanów w liściach roślin z populacji torowych, w stosunku do roślin z populacji leśnych może stanowić dostosowanie, nie tylko do warunków insolacji, lecz także suszy. Potwierdzają to także obserwacje terenowe. Rośliny *G. robertianum* na stanowiskach terenowych, szczególnie w okresie letnim kiedy były narażone na warunki stresu wodnego i insolację, miały intensywnie czerwone liście. Natomiast rośliny *G. robertianum* z populacji leśnych nie były szczególnie narażone w lasach ani na stres wodny, ani na insolację.

Podsumowując, wykazano że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych, w szczególności z populacji torowej z Wal-St (2008), charakteryzuje zwiększona tolerancja na suszę w porównaniu do roślin z populacji leśnych. Susza obok stresu radiacyjnego mogła być zatem kolejnym czynnikiem selekcyjnym, który przyczynił się do powstania nowej formy *G. robertianum* z Waliłach-Stacji.

V.3.3. WPŁYW HERBICYDU ROUNDUP NA ROŚLINY *G. ROBERTIANUM*

Wykorzystanie na torach kolejowych herbicydów w celu usunięcia niepożądaney roślinności jest szczególnie interesującym zagadnieniem, gdyż długotrwale stosowanie tych środków może powodować wytworzenie się biotypów roślin odpornych na dany herbicyd, w wyniku wystąpienia procesów mikroewolucyjnych (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI I IN. 2011; KWIATKOWSKA I IN. 2013; NANDULA I IN. 2005; PEREZ-JONES I IN. 2007; SHRESTHA 2010). W ramach badań sprawdzono, w jaki sposób rośliny *G. robertianum* mogą przetrwać na torach kolejowych pomimo silnych oprysków herbicydem Roundup, którego substancją czynną jest glifosat. Przeprowadzono serię badań z wykorzystaniem tego herbicydu, w trakcie

których wykonano obserwacje morfologiczne liści i ultrastrukturalne komórek liści roślin *G. robertianum* z zastosowaniem transmisyjnego i skaningowego mikroskopu elektronowego.

W ramach niniejszej pracy wykazano, że *G. robertianum* jest gatunkiem wrażliwym na bardzo wysokie dawki glifosatu zawartego w herbicydzie Roundup (dawki wyższe niż te stosowane na torach kolejowych), jednak po oprysku niższymi dawkami (w tym dawką stosowaną na torach kolejowych) rośliny wykazywały tolerancję na tą substancję, objawiającą się stopniową regeneracją liści roślin traktowanych glifosatem. W ramach badań wykazano, że chlorozy na liściach *G. robertianum*, które pojawiły się po oprysku herbicydem Roundup zanikają z biegiem czasu, a młode liście wyrastają bez chloroz po około trzech tygodniach od oprysku. Po około trzydziestu dniach nastąpiła regeneracja ultrastruktury komórek liści roślin potraktowanych herbicydem. Na liściach, gdzie chlorozy powstałe po oprysku roślin herbicydem zaczęły stopniowo zanikać obserwowano mniej zniekształconą strukturę liści niż na liściach, gdzie chlorozy były wciąż dobrze widoczne. Jak wiadomo działanie glifosatu objawia się zahamowanym wzrostem roślin, powstawaniem chloroz i nekroz, żółknięciem liści i pędów, a następnie zamieraniem całych części nadziemnych i korzeni. Jeżeli roślina nie zostanie całkowicie zniszczona przez glifosat, odrastające liście są zniekształcone. Obserwuje się również wyrastanie wielu pędów (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI I IN. 2011; CAMPBELL I IN. 1976; EKER I IN. 2006; TUFFI SANTOS I IN. 2009; VAUGHN, DUKE 1986).

Z danych literaturowych wiadomo, że mechanizm działania glifosatu polega na blokowaniu enzymu syntazy kwasu 5-endolopirogrono-3-fosfoshikimowego (syntaza EPSP), który zlokalizowany jest głównie w chloroplastach (ADAMCZEWSKI 2014). Zasadnym było zatem zastosowanie w ramach badań nad wpływem glifosatu na rośliny *G. robertianum* transmisyjnego mikroskopu elektronowego, dzięki któremu można było poznać wpływ tej substancji na ultrastrukturę komórek liści (w tym ultrastrukturę chloroplastów) u roślin *G. robertianum* potraktowanych herbicydem Roundup. Także w pracach innych badaczy wykorzystano badania ultrastruktury komórek liści różnych gatunków roślin, z zastosowaniem TEM, do oceny wpływu glifosatu na dany gatunek. Przykładowo w pracy CAMPBELL I IN. (1976) badano ultrastrukturę komórek, ze szczególnym zwróceniem uwagi na ultrastrukturę chloroplastów, w liściach *Agropyron repens* L. (perz właściwy) po zastosowaniu glifosatu. Podobnie, jak w badaniach opisywanych w ramach niniejszej pracy, w badaniach CAMPBELL I IN. (1976) wykorzystano transmisyjny mikroskop elektronowy. Już po krótkim czasie od oprysku (24h) CAMPBELL I IN. (1976), po zastosowaniu niższych dawek obserwowali zaburzenia w ultrastrukturze organelli komórkowych, m.in.: pofałdowaną plazmalemę, obrzęk mitochondriów, chloroplastów i siateczki śródplazmatycznej, dodatkowe obłonione struktury w cytoplazmie, odkładanie się elektronogęstych substancji wzdłuż plazmalemmy i ścian komórkowych. W samych chloroplastach obserwowano dodatkowo obrzęk tylakoidów oraz dezorientację gran. Po wyższych dawkach glifosatu obserwowano dodatkowo: agregację gran w chloroplastach, puchnięcie i degradację chloroplastów, zwiększenie częstości występowania w cytoplazmie pęcherzy, odrywanie się plazmalemmy. Powyższe obserwacje po 24h od zastosowania herbicydu z czasem (po 48 i 96h) dla wszystkich dawek były jeszcze lepiej widoczne. Po 192h od oprysku roślin *A. repens* obserwowano: trwałe obrzęki mitochondriów oraz zaburzenia struktury grzebieni mitochondrialnych, liczne plastoglobule w chloroplastach, liczne pęcherze w cytoplazmie,

zaburzoną orientację polarności gran w chloroplastach, przerwanie ścian komórkowych w niektórych komórkach. Ponadto po 192h od oprysku roślin herbicydem obserwowano niewiele chloroplastów i innych organelli w komórkach. Wraz ze wzrostem dawki herbicydu obserwowano stopniową redukcję ziaren skrobi w chloroplastach, dezintegrację tylakoidów – liście traktowane glifosatem stopniowo traciły chlorofil (CAMPBELL I IN. 1976).

W ramach niniejszej pracy wykonano badania nad wpływem glifosatu na ultrastrukturę komórek liści *G. robertianum*. Zastosowano różne dawki herbicydu (niskie i wysokie), obserwowano liście po różnych czasach od oprysku – począwszy od 3 h a kończąc na 48 dniach. Obserwowano także liście w różnym wieku. Po wysokich dawkach herbicydu, część obserwowanych zmian ultrastruktury komórek liści roślin *G. robertianum* była analogiczna do obserwacji dokonanych na innych gatunkach roślin (CAMPBELL I IN. 1976), m.in.: zaburzenia w ultrastrukturze chloroplastów (obrzęk chloroplastów), pojawianie się plastoglobul, czy zanik w niektórych chloroplastach ziaren skrobi. Nie obserwowano natomiast obrzęku mitochondriów, zaburzeń w wyglądzie grzebieni mitochondrialnych, czy dezintegracji struktury tylakoidów w chloroplastach. Również pęcherze w cytoplazmie występowały rzadko. Obserwowano natomiast m.in. tworzenie się dodatkowych przedziałów błonowych w wakuolach, elektronogęste złogi w różnych przedziałach komórkowych, w tym elektronogęste złogi o różnej strukturze w wakuolach. Wygląd tych złogów był zależny od czasu od oprysku herbicydem oraz od dawki herbicydu. Im wyższa dawka herbicydu, tym więcej elektronogęstych złogów obserwowano – początkowo w postaci drobnych ziarnistości w wakuoli, z czasem w postaci dużych złogów. Obserwowano także puchnięcie chloroplastów spowodowane nagromadzeniem ziaren skrobi. Im wyższą dawkę herbicydu zastosowano tym zmiany w ultrastrukturze komórek liści były większe. Największe zmiany obserwowano w przypadku najmłodszych liści, a najmniejsze u liści dojrzałych. Makroskopowo widoczne było to w postaci pojawiających się po około tygodniu od oprysku chloroz na najmłodszych liściach. Wraz z czasem chlorozy te zanikały, zaś ultrastruktura organelli komórkowych była prawidłowa.

W ramach niniejszych badań wykazano również obniżenie fluorescencji chlorofilu w miejscach wystąpienia chloroz na blaszkach liściowych u roślin po oprysku herbicydem Roundup. Zmniejszenie zawartości chlorofilu w liściach po zastosowaniu glifosatu stwierdzili także KITCHEN I IN. (1981) u soi zwyczajnej (*Glycine max* (L.) Merr.), jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare* L.) oraz kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.). Powstawanie chloroz na liściach po zastosowaniu glifosatu można wytłumaczyć degeneracją chloroplastów (CAMPBELL I IN. 1976) lub / i zahamowaniem tworzenia chlorofilu (COLE I IN. 1983). Glifosat i AMPA zmniejszają fotosyntezę u roślin, ale poprzez różne mechanizmy: glifosat zwiększa degradację chlorofilu, podczas gdy AMPA zaburza biosyntezę chlorofilu. Zarówno zwiększona degradacja chlorofilu, jak i jego zmniejszona biosynteza powodują żółknięcie liści i pojawianie się na nich nekroz (GOMES I IN. 2016; VAN BRUGGEN 2018).

Pobieranie i translokacja glifosatu w roślinach jest wzmacniana przez surfaktanty. Głównym adiuwantem i surfaktantem zawartym w herbicydzie Roundup, który sprzyja wnikaniu glifosatu do roślin jest MON 0818, czyli polietoksyłowane aminy tłuszczowe – POEA (GIESY I IN. 2000; WILLIAMS I IN. 2000). Związek ten umożliwia szybką penetrację przez kutikulę herbicydu i niszczenie integralności błon komórkowych leżących pod nią

komórek, zwiększając wchłanianie glifosatu (LEAPER I HOLLOWAY 2000). W ciągu 6 godzin po zastosowaniu Roundupu następuje gwałtowna absorpcja MON 0818, natomiast maksimum absorpcji (84%) przypada na 24 godziny po aplikacji (SHERRICK I IN. 1986). W ramach niniejszych badań nie zaobserwowano, aby ultrastruktura kutikuli, czy epidermy górnej w liściach *G. robertianum* była zmieniona po krótkich czasach od zastosowania herbicydu.

Największe zaburzenia w ultrastrukturze komórek liści obserwowano w przypadku roślin *G. robertianum* potraktowanych bardzo wysoką dawką herbicydu. Widoczne były wtedy m.in. uszkodzenia floemu w wiązce przewodzącej oraz plazmoliza w komórkach miękiszu gąbczastego. Pomiedzy komórkami miękiszu palisadowego i gąbczastego były mniejsze przestwory komórkowe niż w kontroli. W komórkach tych liści występowało znacznie więcej różnego rodzaju złożeń niż w kontroli. Przy niższych dawkach herbicydu ultrastruktura organelli w komórkach nie była tak zmieniona, poza tym wraz z czasem obserwowano stopniową regenerację liści. Uzyskane wyniki pokazały, że reakcja roślin *G. robertianum* na herbicyd Roundup jest bardzo złożona. Rośliny nie były całkowicie niszczone a z czasem następowała regeneracja uszkodzonych liści roślin *G. robertianum*, co było uzależnione od podanej dawki herbicydu Roundup. Dla porównania w pracy TUFFI SANTOS I IN. (2009), gdzie badano dwa gatunki eukaliptusów *Eucalyptus grandis* i *E. urophylla*, także po zastosowaniu niższej dawki herbicydu Roundup obserwowano z czasem (45 dni po aplikacji herbicydu) całkowitą regenerację badanych roślin.

V.3.4. PORÓWNANIE TOLERANCJI ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH NA HERBICYD ROUNDUP

W ramach niniejszej pracy doktorskiej porównano reakcję roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. Chciano sprawdzić, czy stosowanie herbicydu na torach kolejowych mogło się przyczynić do zwiększenia tolerancji na herbicyd roślin z populacji torowych w stosunku do roślin z populacji leśnych. Podejrzewano także, że oprysk herbicydami mógł być jednym z czynników selekcyjnych, który przyczynił się do powstania na torach kolejowych w Walichach odrębnej formy *G. robertianum*.

Przez tolerancję rośliny na herbicyd rozumiemy zdolność gatunku do przeżycia i reprodukcji po użyciu herbicydu w zalecanej dawce. Tolerancja jest cechą dziedziczną, przekazywaną potomstwu (ADAMCZEWSKI 2014). W obrębie populacji roślin tego samego gatunku herbicydy mogą wpływać na przebieg procesu selekcji, co wiąże się z uodparnianiem się roślin na środki chwastobójcze, które są często i powszechnie używane (CHRISTOFFERS 1999). Z kolei przez odporność chwastów na herbicydy rozumiemy naturalną lub indukowaną zdolność niektórych roślin do przeżycia i rozmnażania po ekspozycji na śmiertelną dawkę herbicydu, podczas gdy pozostała część populacji zamiera. Odporność na herbicydy może być wynikiem pojedynczej mutacji lub zastosowania technik inżynierii genetycznej (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI, DOBRZAŃSKI 2012A). Głównymi czynnikami wpływającymi na wykształcenie odporności wśród roślin (chwastów) są: stosowanie herbicydów o jednym mechanizmie działania na tym samym obszarze przez kilka lat, niewłaściwy dobór środków do składu gatunkowego chwastów, nieodpowiednia faza rozwojowa roślin w momencie aplikacji środka, niesprzyjające warunki pogodowe i środowiskowe dla prawidłowego działania preparatu (ADAMCZEWSKI 2014). Wykształcenie

odporności na glifosat jest związane ze stałym jego użytkowaniem. Na terenach, gdzie jest on stosowany powstają biotypy wykazujące odporność na glifosat (ADAMCZEWSKI 2014; PRACZYK I SKRZYPCZAK 2004; STEINMANN I IN. 2012).

Badania pokazały, że rośliny z populacji torowych – w szczególności z Zubek Białostockich i Białegostoku Fabrycznego, charakteryzowała niemal dwukrotnie wyższa tolerancja na herbicyd Roundup niż rośliny z populacji leśnych (zastosowano jednorazową dawkę stosowaną na torach kolejowych). Objawiało się to lepszą kondycją zarówno całych roślin, jak i najmłodszych liści roślin z populacji torowych, w porównaniu do roślin z populacji leśnych. Najmłodsze liście roślin z populacji leśnych po około miesiącu od oprysku herbicydem usychały, zaś rośliny zamierały (uschło 75% roślin z populacji leśnych). W przypadku roślin z populacji torowych z Białegostoku Fabrycznego, Walił-Stacji i Zubek Białostockich po upływie miesiąca od oprysku herbicydem zdecydowana większość roślin pozostała żywa (uschło jedynie 38% roślin z populacji torowych). Wynik uzyskany z obserwacji makroskopowych wskazuje na wyższą tolerancję na herbicyd Roundup roślin *G. robertianum* z populacji torowych (w szczególności roślin z dużych stacji Białystok Fabryczny i Zubki Białostockie) niż roślin z populacji leśnych.

U roślin *G. robertianum* z populacji torowych po oprysku herbicydem nie obserwowano zmienionej ultrastruktury komórek liści w porównaniu do kontroli. Zaobserwowano jednak liczne elektronogęste złogi w wakuolach, które obejmowały całe wakuole i pojawiały się znacznie częściej niż w kontroli. Zaobserwowano, że rośliny *G. robertianum* z populacji leśnej po oprysku herbicydem Roundup miały silnie zmienioną ultrastrukturę komórek liści. Dobrze widoczne były uszkodzenia ultrastruktury chloroplastów u roślin z populacji leśnej. Uzyskane wyniki można porównać z pracą CAMPBELL I IN. (1976), gdzie badano na perzu właściwym (*Agropyron repens* L.), który jest wrażliwy na glifosat wpływ tej substancji na ultrastrukturę komórek. Po 24 godzinach od zastosowania glifosatu obserwowano puchnięcie chloroplastów, ich agregację, zaburzoną orientację polarności gran oraz całkowite zniszczenie chloroplastów. Ponadto obserwowano niewielkie puchnięcie innych organelli (mitochondrium, siateczki endoplazmatycznej). Wokół błony i ściany komórkowej zaobserwowano po zastosowaniu glifosatu ciała elektronogęste (CAMPBELL I IN. 1976). Zmiany obserwowane w ultrastrukturze komórek liści u roślin *G. robertianum* z populacji leśnej po oprysku herbicydem były podobne do tych opisanych w pracy CAMPBELL I IN. (1976). Natomiast tego typu zmian nie obserwowano u roślin *G. robertianum* z populacji torowych. Wykazano, że po oprysku herbicydem Roundup zmiany ultrastruktury komórek liści roślin z populacji torowych były mniejsze niż w przypadku roślin z populacji leśnych. W pracy VAUGHN, DUKE (1986) zaobserwowano u roślin *Glycine max* (L.) Merr. po zastosowaniu glifosatu zaburzenia struktury gran tylakoidów i układanie się tylakoidów w grana o łukowatym / spiralnym kształcie. Zmianę wyglądu gran tylakoidów obserwowano jedynie u roślin *G. robertianum* z populacji leśnej. Natomiast tego typu zmian nie obserwowano u roślin z populacji torowych z Walił-Stacji i Białegostoku Fabrycznego.

Stres wywołany działaniem herbicydów, może przyczyniać się do pozytywnej selekcji roślin. Taka selekcja wynika z tego, iż zdolne do przetrwania są tylko organizmy o dużej odporności na stres i zdolności do przystosowania się do panujących warunków stresowych. W aspekcie ewolucyjnym w wyniku selekcji mogą powstać formy, które uodporniły się na

czynniki stresowe. W wyniku częstego stosowania herbicydów osobniki odporne mogą zacząć dominować w niszy ekologicznej (ADAMCZEWSKI 2014; ADAMCZEWSKI, DOBRZAŃSKI 2012B; LARCHER 1987). W pracy BAUCOM, MAURICIO (2004) badano biotypy wilca purpurowego (*Ipomoea purpurea* L.) wrażliwe i nie wrażliwe na glifosat. W przypadku wrażliwych biotypów *I. purpurea* typowym objawem działania Roundupu jest chloroza i nekroza liści oraz zniszczenie wierzchołka wzrostu. Autorzy w swojej pracy przyjęli, że biotyp tolerancyjny na glifosat to taki, który po zastosowaniu herbicydu jest zdolny do reprodukcji i wydania nasion. W powyższych badaniach wykazano, że rośliny *I. purpurea* z biotypu najlepiej tolerującego glifosat produkowały o 35% nasion mniej przy braku oprysku herbicydem Roundup niż biotyp *I. purpurea* najbardziej wrażliwy na działanie glifosatu (BAUCOM, MAURICIO 2004). Również inni badacze wskazywali na występowanie takiego zjawiska na przykładzie innych gatunków roślin oraz innych herbicydów (BERGELSON I IN. 1996; WARWICK 1991). Egzystencja uodpornionych na dany herbicyd biotypów roślin jest uzależniona od substancji aktywnej, na którą się uodporniły. Biotypy odporne mogą posiadać cechy wskazujące, że ich zdolność do rozwoju, przetrwania i rozmnażania jest gorsza niż biotypu wrażliwego, gdy brakuje czynnika stresowego, czyli herbicydu, który wywołał odporność. Zaniechanie lub zmniejszenie częstotliwości stosowania herbicydu może prowadzić do wyeliminowania biotypów odpornych (ADAMCZEWSKI, DOBRZAŃSKI 2012B).

W ramach niniejszej dysertacji opisano jak na kwitnienie roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnej wpływa oprysk herbicydem Roundup. Po potraktowaniu roślin *G. robertianum* czynnikiem stresowym w postaci herbicydu Roundup, we wszystkich badanych populacjach obserwowano wzrost liczby pąków i kwiatów na roślinach a spadek liczby owoców. Oprysk herbicydem Roundup miał największy stymulujący wpływ na wytwarzanie pąków i kwiatów na rośliny z populacji torowych – zwłaszcza roślin z populacji leśnej Wal-St (2008), w porównaniu do roślin z populacji leśnej Zaj-Las (2014). Uzyskane wyniki można porównać z pracą GOVE I IN. (2007), gdzie wykazano, że leśna populacja *G. robertianum* była jednym z najbardziej wrażliwych gatunków na oprysk glifosatem, spośród sześciu badanych gatunków. Po oprysku w stosunku do kontroli znacząco zmniejszyła się biomasa roślin, tym bardziej im większą dawkę glifosatu zastosowano. W badaniach tych nie stwierdzono jednak, aby oprysk tłumił kwitnienie *G. robertianum*, rośliny te w porównaniu do innych gatunków leśnych okazały się w tym wypadku najmniej wrażliwe. Rośliny *G. robertianum* wykazały natomiast przy zastosowaniu wyższych dawek glifosatu produkcję mniejszej liczby nasion, wynik ten był nieistotny statystycznie (GOVE I IN. 2007). W pracy SHRESTHA I IN. (2010) badano biotypy odporne i wrażliwe na glifosat przymiotna kanadyjskiego (*Conyza canadensis* L.). Wyniki tych badań wskazują na zmiany faz rozwojowych i cech morfologicznych u biotypów odpornych na glifosat (np. początek wzrostu pędu, pojawienie się pierwszego pąku kwiatowego, pierwszego kwiatu i nasion) przebiegały szybciej niż u biotypów wrażliwych. Ponadto biotypy *C. canadensis* odporne na glifosat były wyższe i wydawały więcej nasion, niż biotypy wrażliwe. Jednak biotypy odporne charakteryzowała w fazie kwitnienia mniejsza biomasa od biotypów wrażliwych (SHRESTHA I IN. 2010). Podobne zależności obserwowano także w przypadku badanych populacji torowych i leśnych *G. robertianum*. Wydaje się, że regularne opryski na torach kolejowych mogły sprawić, że populacje torowe *G. robertianum*, w tym populacja z Wali-

Stacji, oprócz przystosowania do nadmiernej insolacji oraz niedostatku wody, przystosowały się również do oprysków herbicydami. Populacje torowe są zarówno zdolne do przetrwania „stresu herbicydowego”, jak i do reprodukcji pomimo oprysków herbicydem Roundup.

Warto wspomnieć, że dzięki rozwojowi metod inżynierii genetycznej stworzono genetycznie modyfikowane rośliny uprawne (tzw. *Roundp Ready*) odporne na działanie glifosatu. Miało to pomóc rolnikom w zwalczaniu chwastów, a tym samym w zwiększeniu plonów. Jednak częste i długotrwałe opryski pól uprawnych herbicydem Roundup spowodowały uodpornianie się chwastów na ten herbicyd. Na liście HRAC (*Herbicide Resistance Action Committee*) można znaleźć informację, że obecnie potwierdzono odporność na glifosat 32 gatunków chwastów w 25 krajach, w tym jeden w Polsce (ADAMCZEWSKI 2014; HEAP 2016). W USA, na skutek coraz powszechniejszej uprawy roślin *Roundp Ready* i stosowania herbicydu Roundup na polach, pojawiły się chwasty odporne na glifosat, np. *Conyza canadensis* (ADAMCZEWSKI, DOBRZAŃSKI 2012A). Powszechność stosowania glifosatu w herbicydach sprawiła, że nastąpiła intensywna selekcja genów odpornych na tą substancję (ADAMCZEWSKI 2014). Przykładowo, badania prowadzone na odpornym biotypie *Amaranthus palmeri* wykazały, że u rośliny tej występuje nadekspresja genu EPSP, spowodowana rozrzeszeniem genu EPSP (ADAMCZEWSKI 2014). Badania YUAN I IN. (2002) nad *Dicliptera chinensis* są przykładem odporności na glifosat wynikającej z wyższej aktywności syntazy EPSP. Ponadto badania prowadzone na odpornym szczepie *Lolium multiflorum* dowodzą, iż odporność na glifosat może też wynikać z jego ograniczonego transportu w roślinie – w kontroli glifosat transportowany był do podstawy blaszki liściowej, kolanka i korzeni, u szczepu odpornego na glifosat zmagazynowany został na końcu blaszki liściowej. W tym przypadku glifosat przemieszczał się ksylemem, a jego wnikanie do apoplastu było ograniczone (PEREZ-JONES I IN. 2007).

Gatunkiem, u którego stwierdzono brak reakcji na glifosat jest *Equisetum arvense*, który pojawia się także na nasypach kolejowych (TORSTENSSON 2001; TORSTENSSON I IN. 2005). Do tej pory stwierdzono niewiele biotypów roślin występujących na torach kolejowych, które uodporniły się na stosowany tam glifosat. Są to biotypy: *Conyza canadensis* z torów kolejowych w Polsce, Czechach i Japonii (ADAMCZEWSKI I IN. 2011; ADAMCZEWSKI 2014; CHADOWÁ I IN. 2009; HAMOUZOVÁ I IN. 2009, 2012; NAGAI I IN. 2015; HEAP 2016), *Lolium rigidum* z torów w Australii (MALONE I IN. 2012; HEAP 2016) oraz *Parthenium hysterophorus* z torów w USA (FERNANDEZ I IN. 2015; HEAP 2016). W Polsce odporny biotyp *C. canadensis* stanowiły osobniki występujące na torach kolejowych na przedmieściach Poznania, na których stale stosuje się oprysk herbicydem Roundup. Mechanizm odporności tego biotypu na glifosat nie został poznany (ADAMCZEWSKI I IN. 2011; ADAMCZEWSKI 2014; HEAP 2016). Wykazanie podwyższonej tolerancji na glifosat u roślin *G. robertianum* z populacji torowych w stosunku do populacji leśnych jest pierwszym opisanym przypadkiem dla tego gatunku, a drugim takim przypadkiem w Polsce dla gatunku występującego na torach kolejowych.

Kolejnym zagadnieniem, które było badane w ramach niniejszej pracy doktorskiej to odpowiedź na pytanie jaką dawkę herbicydu Roundup otrzymują rośliny *G. robertianum* podczas oprysku. Wchłanianie dolistne pestycydów jest złożonym procesem, zależnym m.in. od charakterystyki powierzchni liści pryskanych roślin (WANG, LIU 2007). Z badań innych

badaczy wiadomo, że glifosat rozkłada się do AMPA już w żywych roślinach (VAN BRUGGEN 2018). Hydrauliczny rozprysk roztworów wodnych glifosatu jest nieefektywny i tylko niewielka część zastosowanej dawki herbicydu dociera do roślin. Część oprysku m.in. odbija się od roślin i herbicyd nie osiada na liściach, część oprysku natomiast odparowuje. Tego typu straty mogą być jednak niwelowane poprzez dodanie do herbicydu odpowiednich adiuwantów, takich jak np. środki powierzchniowo czynne i materiały polimerowe (LEAPER, HOLLOWEY 2000). Jak już wcześniej wspomniano, skuteczność działania glifosatu zwiększa dodanie adiuwantu MON 0818, będącego surfaktantem, czyli substancji zwiększającej zdolność adsorbowania się herbicydu na powierzchni liści (LIU 2004; SHERRICK I IN. 1986). Adiuwant ten stosowany jest w herbicydzie Roundup. W ramach niniejszej pracy wykazano, że rośliny *G. robertianum* podczas oprysku pobierają różne dawki herbicydu Roundup, pomimo że tą samą dawkę herbicydu zastosowano do oprysków. Rośliny z populacji torowych zawierały najczęściej więcej glifosatu i AMPA niż rośliny z populacji leśnych. Średnia zawartość glifosatu w populacjach torowych wynosiła 197,72 mg/kg, a AMPA 5,67 mg/kg. Natomiast średnia zawartość glifosatu w populacjach leśnych wynosiła 95,52 mg/kg, a AMPA 3,90 mg/kg. Uzyskane dane wskazują, że zawartość glifosatu i AMPA w roślinach po oprysku herbicydem Roundup zależy od liczby liści w rozetach i ich rozmieszczenia na roślinie, czyli powierzchni, która miała bezpośredni kontakt z herbicydem. Im więcej liści ma roślina, tym jest większa łączna powierzchnia blaszek liściowych. Przykładowo, w pracach WANG, LIU (2007) oraz LIU (2003) pokazano, że skuteczność pobierania przez trawy glifosatu zależy, nie od samej zastosowanej dawki przy oprysku, lecz od dawki, która zgromadziła się na powierzchni liści. Prace te potwierdzałyby tezę, że pobrana przez rośliny *G. robertianum* dawka herbicydu mogła zależeć od łącznej powierzchni liści na roślinach.

Prace innych badaczy pokazują, że na skuteczność i wydajność stosowania pestycydów mogą mieć wpływ m.in. warunki pracy opryskiwacza, właściwości fizyczne mieszanek natryskowej, drobne struktury na powierzchni liści oraz dominujący mikroklimat (FOX I IN. 1992; REICHARD I IN. 1986; YU I IN. 2009). Możliwe, że pokrycie roślin *G. robertianum* włoskami gruczołowymi także mogło mieć wpływ na pobieranie przez te rośliny herbicydu. Wpływ różnych struktur znajdujących się na powierzchni liści badało wielu badaczy, np. CHACHALIS I IN. (2001A, B), HATTERMAN-VALENTI I IN. (2006). W pracy YU I IN. (2009) badano *Pelargonium stenopetalum*, której liście pokryte są woskowym osadem i posiadają niewiele włosków, oraz *Pelargonium tomentosum*, której liście są intensywnie pokryte włoskami. Do badań wykorzystano oprysk generujący pięć różnych rozmiarów kropel. Wykorzystano także trzynaście różnych roztworów, w tym różne pestycydy, surfaktanty oraz wodę destylowaną. Czas odparowywania roztworów z powierzchni liści wzrastał wykładniczo, wraz ze wzrostem kropel generowanych przez opryskiwacz. Na czas parowania roztworów z powierzchni liści miały wpływ m.in. dodanie środków powierzchniowo czynnych lub substancji przeciwdziałających znoszeniu roztworów przy oprysku, jak również wielkość kropli i wilgotność względna. Przykładowo, dodanie środka powierzchniowo czynnego zwiększyło powierzchnie pokrycia liści poszczególnymi roztworami. Wykazano, że ewaporacja (parowanie) roztworów z powierzchni liści u *Pelargonium* była dłuższa w przypadku liści pokrytych woskiem, a krótsza u liści intensywnie pokrytych włoskami (YU I IN. 2009). Jak wiadomo rośliny *G. robertianum*

w całości pokryte są włoskami gruczołowymi. Występują trzy rodzaje włosków wydzielniczych – typ I i II wydzielają terpenoidy i fenole, występują one na liściach. Typ III jest bardziej powszechny na strukturach kwiatu, włoski te gromadzą antocyjany i wydzielają flawonoidy (PEDRO I IN. 1990). W ramach badań wykorzystujących skaningowy mikroskop elektronowy zaobserwowano, że chlorozy na powierzchni liści u roślin *G. robertianum* występują między wiązkami przewodzącymi. Zaobserwowano także, że dokładnie na wiązkach przewodzących u roślin *G. robertianum* zlokalizowane są dość gęsto włoski średniej długości. Możliwe zatem jest, że te miejsca chronione są przed herbicydem, gdyż krople herbicydu podczas oprysku zatrzymują się na powierzchni włosków. Warto zauważyć także, że na liściach *G. robertianum* są także włoski krótkie i długie, rozsiane w różnych miejscach na powierzchni liści. Różna długość włosków może dodatkowo przyczyniać się do zróżnicowanego zatrzymywania kropel herbicydu, z dala od powierzchni liści.

Podsumowując, pokrycie liści roślin *G. robertianum* może stanowić ochronę przed docieraniem do ich powierzchni herbicydu. Warto także zauważyć, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych pobrały średnio wyższą dawkę herbicydu Roundup niż rośliny z populacji leśnych, najprawdopodobniej ze względu na większą liczbę liści w rozetach. Wykazano także, że rośliny z populacji torowych charakteryzuje wyższa tolerancja na herbicyd Roundup niż rośliny z populacji leśnych. Zatem, u roślin występujących na torach kolejowych, na skutek regularnych oprysków herbicydem, musiał wytworzyć się jakiś dodatkowy mechanizm ochronny przed działaniem herbicydu, który równocześnie nie występuje u roślin z populacji leśnych. W przyszłości, należałoby sprawdzić na czym ten mechanizm polega oraz, czy ma on podłoże genetyczne czy epigenetyczne. Przykładowo, odporność roślin na glifosat może być związana z mutacją sekwencji EPSPS (Pro106) lub może być wynikiem rozszerzenia genu EPSPS (ADAMCZEWSKI 2014).

V.4. BIOLOGIA REPRODUKCJI ROŚLIN *G. ROBERTIANUM*

Według literatury kwiaty *G. robertianum* są obupłciowe (hermafrodytyczne) i homogamiczne (równoczesne dojrzewanie pręcików i słupka w kwiecie). Jednak zdarza się także, że kwiaty mogą być przedprątne (tzw. protandria – wcześniejsze dojrzewanie pręcików niż słupków) lub przedślupne (tzw. protogynia – wcześniejsze dojrzewanie słupków niż pręcików) (BERTIN 2001; ENDRESS 2010; GRIME I IN. 1988; TOFTS 2004). Wielu autorów wskazuje także na możliwość wystąpienia samozapylenia u roślin *G. robertianum* (BERTIN 2001; YEO 1985; TOFTS 2004).

W ramach niniejszych badań sprawdzano wystąpienie u *G. robertianum* zjawiska agamospermii (proces rozmnażania wegetatywnego, który polega na rozmnażaniu za pomocą nasion, w których zarodek powstaje bez zapłodnienia komórki jajowej – tzw. partenogeneza, lub z innej komórki woreczka zalążkowego – tzw. apogamia). Sprawdzano również możliwość wystąpienia procesu samozapylenia (zapylenie słupka pyłkiem pochodzącym z pręcików z tego samego kwiatu lub innych kwiatów, jednak rosnących na tej samej roślinie). Podejrzewano, że u roślin *G. robertianum* z populacji torowych w wyniku reakcji na czynniki stresowe, takie jak insolacja, susza, czy oprysk herbicydami mogło dojść do reprodukcji na drodze agamospermii lub samozapylenia. Tłumaczyłoby to odrębność roślin

G. robertianum z populacji torowej z Walił od innych populacji, przy równoczesnym znacznym podobieństwie do siebie poszczególnych osobników w obrębie tej populacji. Wykazano jednak, że w torowych i leśnych populacjach roślin *G. robertianum* nie wystąpiło zjawisko agamospermii ani samozapylenia. Zarówno rośliny z populacji torowych, w tym również z populacji Wal-St (2008), jak i rośliny z populacji leśnej wymagały zapylenia kwiatów do wytworzenia nasion. W pracy MARTIN (1965), gdzie badano inny gatunek bodziszka – *Geranium maculatum* (bodziszek plamisty), wykazano, że gatunek ten jest zdolny do samozapylenia, jednak nie obserwowano zjawiska partenogenezy, czyli powstawania zarodka z komórki jajowej bez zapłodnienia. W badaniach MARTIN (1965), zastosowano analogiczne metody badań, jak w niniejszej pracy (ZYCH I IN. 2013).

Biorąc pod uwagę wszystkie przeprowadzone doświadczenia nie zaobserwowano dużych różnic między kwitnieniem i owocowaniem populacji torowych i leśnych. W większości doświadczeń, w obu typach populacji zakwitło około 80-100% z obserwowanych pąków kontrolnych, zaś owocowało od 60 do 100%. Dla porównania, w pracy MARTIN (1965), gdzie badano *G. maculatum*, wykazano, że rośliny uprawiane w pełnym słońcu wykazują większy wigor kwitnienia i owocowania niż rośliny z siedlisk zacienionych. W przypadku obserwacji terenowych, w ramach niniejszej pracy także zaobserwowano, że rośliny *G. robertianum* z populacji torowych, które występują najczęściej w słonecznych miejscach, mają więcej kwiatów i owoców niż rośliny z populacji leśnych, które najczęściej występują w zacienionych miejscach. Warto jednak zaznaczyć, że badania reprodukcji roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych nie były prowadzone w warunkach stresowych. W przyszłości, należałoby sprawdzić, jak wygląda reprodukcja u tego gatunku, gdy osobniki są narażone na wysokie natężenie światła i niedobór wody. Warto, by było także sprawdzić, czy po oprysku herbicydem Roundup dochodzi do wystąpienia u roślin *G. robertianum* zjawiska agamospermii lub samozapylenia.

V.5. ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA ROŚLIN *G. ROBERTIANUM* Z POPULACJI TOROWYCH I LEŚNYCH ORAZ ZACHODZENIE PROCESÓW EPIGENETYCZNYCH

Ostatnim etapem badań nad roślinami *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych były badania genetyczne. Do analizy zmienności organizmów można stosować systemy markerów molekularnych, które ujawniają zmienność sekwencji nukleotydowej DNA (SZTUBA-SOLIŃSKA 2005). W ramach niniejszej pracy doktorskiej do badań genetycznych wykorzystano metodę AFLP, czyli polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów (ang. *amplified fragment length polymorphism*). Metoda ta polega na trawieniu matrycowego DNA enzymami restrykcyjnymi, a następnie poddaniu uzyskanych fragmentów DNA dwukrotnie amplifikacji: niespecyficznej i specyficznej (VOS I IN. 1995). Polimorfizm dotyczy różnic w długości amplifikowanych fragmentów, które powstają na skutek substytucji nukleotydowych w obrębie albo w pobliżu miejsc restrykcyjnych lub na skutek delecji czy insercji. Większość tego polimorfizmu jest dominująca (AVISE 2008).

Startery do przeprowadzenia reakcji AFLP w ramach niniejszych badań wybrano w oparciu o pracę ERNST I IN. (2013), w której uzyskano zadawalające rezultaty dla spokrewnionego z *G. robertianum* gatunku *Geranium sylvaticum* L. (bodziszek leśny). W pracy tej wykazano raczej niskie zróżnicowanie genetyczne pomiędzy populacjami

G. sylvaticum na obszarze gór Taunus w Niemczech. Inną pracą, w której skutecznie wykorzystano metodę AFLP do badania zróżnicowania genetycznego roślin, była praca MICHALSKI, DURKA (2012), gdzie badano *Geranium pratense* L. (bodziszek łąkowy) z obszaru centralnych Niemiec. Także i w tym przypadku badane populacje *G. pratense* wykazywały wg autorów raczej małe zróżnicowanie genetyczne (MICHALSKI, DURKA 2012).

Poza wykorzystaną w niniejszych badaniach metodą AFLP, do najczęściej stosowanych systemów markerowych należą metody (AVISE 2008; FREELAND 2008; NOWAK, GRUSZCZYŃSKA 2007; PILOT I IN. 2005; SZTUBA-SOLIŃSKA 2005):

- **RFLP** – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction fragment length polymorphism*). Był to pierwszy typ markerów DNA, który znalazł szerokie zastosowanie w analizie zmienności genetycznej na poziomie DNA, a nie na poziomie białek (NEUHAUS-URL, NEUHAUS 1993; SOUTHERN 1975).
- **RAPD** – losowa amplifikacja polimorficznego DNA (ang. *random amplification of polymorphic DNA*). Metoda ta sprawdza się w badaniach filogenetycznych, w wykrywaniu różnic międzygatunkowych lub między szczepami w obrębie gatunku, jednak charakteryzuje ją mała powtarzalność (EDWARDS 1998; WELSH, MCCLELLAND 1990; WILLIAMS I IN. 1990).
- **SNP** – polimorfizm punktowy (ang. *single nucleotide polymorphism*). Jest to polimorfizm pojedynczych pozycji nukleotydowych w obrębie badanej sekwencji, które różnią się między osobnikami (BROOKES 1999; COLLINS I IN. 1998; KENDAL 2003; MORIN I IN. 2004).
- **sekwencje mikrosatelitarne** – nazywane także mikrosatelitami, prostymi powtórzonymi sekwencjami (SSR – ang. *simple sequence repeats*) lub krótkimi powtórzeniami tandemowymi (STR – ang. *short tandem repeats*). Są to fragmenty DNA składające się z tandemowych powtórzeń motywu nukleotydowego o długości od 1 do 6 par zasad. Mikrosatelity są bardzo przydatne w odtwarzaniu względnie niedawnych procesów genetycznych w populacjach (GUICHOUX I IN. 2011; LI I IN. 2002; SCRIBNER, PEARCE 2000).
- **SSCP** – polimorfizm konformacji pojedynczej nici DNA (ang. *single strand conformation polymorphism*). Metoda ta polega na detekcji polimorfizmu z zastosowaniem elektroforezy zdenaturowanego jednoniciowego DNA, którego konformacja ulega zmianie pod wpływem punktowych substytucji, delecji lub insercji. Jest ona najczęściej stosowana w połączeniu z metodą PCR (ORITA I IN. 1989; WANG I IN. 2001).

Ponieważ metoda AFLP była wielokrotnie stosowana w badaniach dotyczących zróżnicowania genetycznego oraz szeroko pojętej ekologii populacyjnej różnych gatunków roślin (ABRATOWSKA I IN. 2012; ALARCÓN I IN. 2012; BARCACCIA I IN. 1999; BECKER, ALBERS 2009; CERVERA I IN. 2002; ERNST I IN. 2013; KUTA I IN. 2014; MICHALSKI I IN. 2010; MICHALSKI, DURKA 2012; RONKIER I IN. 2008; STEFANOWICZ-HAJDUK 2008; WASSOM, TRANEL 2005; WĄSOWICZ I IN. 2014), wydawała się ona odpowiednim narzędziem do oceny zróżnicowania genetycznego roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych.

Przeprowadzone badania genetyczne miały pomóc w odpowiedzi na pytanie czy nowo odkryta forma *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym istotnie różni się od roślin z innych populacji torowych i leśnych? Chciano się także dowiedzieć, czy w przypadku pozostałych badanych populacji występują różnice genetyczne pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych.

Podejrzewano, że czynniki selekcyjne występujące na torach kolejowych a nie występujące w lasach (insolacja, niedobór wody, oprysk herbicydami) mogły doprowadzić do zróżnicowania genetycznego populacji *G. robertianum* występujących na badanym obszarze w północno-wschodniej Polsce. Spodziewano się, że populacje *G. robertianum* występujące na torach kolejowych i wykazujące adaptacje do niesprzyjających warunków środowiskowych, mogą być różne pod względem genetycznym od populacji występujących w lasach. Spodziewano się także, że populacja *G. robertianum* występująca na torach kolejowych w Waliłach-Stacji, fenotypowo różna od innych badanych populacji, różni się genetycznie nie tylko od roślin z populacji leśnych, lecz także od roślin z populacji torowych występujących na badanym obszarze. Jednak, przeprowadzona analiza struktury genetycznej populacji leśnych i torowych *G. robertianum* pokazała, że nie stanowią one dwóch oddzielnych grup. Wykazano, że występuje bardzo niskie zróżnicowanie pomiędzy tymi grupami populacji. Obserwowana zmienność genetyczna w badanych populacjach roślin *G. robertianum* była głównie efektem zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego, zaś w znacznie mniejszym stopniu zróżnicowania pomiędzy populacjami. Zatem populacje *G. robertianum* występujące na torach kolejowych nie były efektywnie izolowane. Nie wykazano także, aby populacja *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym różniła się od roślin z innych populacji torowych i leśnych. Rangę taksonomiczną roślin z Walił należy określić jako „forma”. Jest to kategoria systematyczna niższa od odmiany. Do kategorii forma zaliczane są osobniki rzadko występujące w populacjach danego gatunku, wyróżniające się od pozostałych osobników pojedynczymi cechami, zaś ich występowanie jest związane najczęściej jedynie z niewielkimi modyfikacjami genetycznymi (STACE 1993).

Powstaje jednak pytanie, jak to możliwe, że pomimo braku różnic genetycznych pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych występują różnice w fenotypie tych dwóch grup. Co, więcej część różnic np. mniejsze blaszki liściowe, większa zawartość antocyjanów w liściach, tolerancja na suszę i herbicyd Roundup jest utrwalona i występuje u roślin z populacji torowych z kolejnego pokolenia, przy hodowli roślin w jednakowych warunkach (brak czynników stresowych). Zatem zmiany te nie mogą być jedynie wynikiem różnic siedliskowych, ponieważ część cech jest dziedziczona. Najprawdopodobniej na skutek niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych zachodzą procesy natury epigenetycznej. Wydaje się, że w warunkach stresowych może dochodzić do znacznego zwiększenia częstości zmian epigenetycznych, które mogą zwiększać zmienność fenotypową u *G. robertianum* i przyspieszać proces adaptacji tych roślin do niesprzyjających warunków. Prawdopodobnie odmienność formy *G. robertianum* z Walił-Stacji wynika właśnie ze zmian epigenetycznych. Są one aktywowane pod wpływem niekorzystnych warunków środowiskowych panujących na torach kolejowych i mogą się utrzymywać przez kilka pokoleń, pomimo zaniku czynnika stresowego.

Termin „epigenetyka” jest ogólnie stosowany w odniesieniu do klasy dziedzicznych zdarzeń molekularnych obejmujących szeroki zakres mechanizmów regulacyjnych, które nie obejmują zmiany w sekwencji DNA (RAPP, WENDEL 2005). Dziedziczenie epigenetyczne polega na dziedziczeniu przez organizm potomny jakiejś cechy bez zmian w sekwencji DNA. Nośnikiem pamięci epigenetycznej jest struktura chromatyny i oddziałujące z nią białka. Pierwsza grupa dziedzicznych modyfikacji chromatyny to modyfikacje białek histonowych

polegające na dołączeniu do nich określonych grup chemicznych. Modyfikacjom, takim jak fosforylacja, ubikwitynacja, acetylacja, czy metylacja, najczęściej podlegają ogony histonowe. Modyfikowane histony rozpoznawane są przez odpowiednie białka, które mogą dokonywać dalszych modyfikacji chromatyny. Acetylacja i fosforylacja histonów są modyfikacjami mało stabilnymi. Natomiast metylacja histonów jest utrzymywana z dużą stabilnością nawet w czasie podziałów komórkowych. Innym procesem biochemicznym odpowiedzialnym za dziedziczenie epigenetyczne jest metylacja DNA, która podobnie jak metylacja histonów jest trwała i ulega skutecznie dziedziczeniu podczas replikacji. W wielu przypadkach o zainicjowaniu stanu epigenetycznego decydują także cząsteczki RNA powstałe w procesie nazywanym interferencją RNA. Jest to zjawisko wyciszania albo wyłączenia ekspresji genu, którego aktywność może w jakiś sposób zagrozić komórce (CHINNUSAMY, ZHU 2009; GRATIVOL I IN. 2012; JAENISCH, BIRD 2003; PUY I IN. 2018; WIERZBICKI 2004).

Trwałość pamięci epigenetycznej ma istotne znaczenie dla funkcji tego procesu. Można wyróżnić trzy poziomy jej trwałości. Pierwszy poziom występuje, gdy stan chromatyny utrzymywany jest przez pewien czas, jednak nie jest przekazywany podczas podziałów mitotycznych. W takiej sytuacji dziedziczenie epigenetyczne ma jedynie znaczenie pomocnicze wobec mechanizmów aktywacji i represji transkrypcji. Drugi poziom trwałości to sytuacja, gdy pamięć epigenetyczna jest przekazywana przez podziały mitotyczne. Wówczas dziedziczenie epigenetyczne może mieć istotne znaczenie w rozwoju i różnicowaniu. Trzeci poziom to natomiast przekazywanie znaków epigenetycznych z pokolenia na pokolenie. W takiej sytuacji dziedziczone epigenetycznie cechy stają się istotne z punktu widzenia ewolucji (IWASAKI, PASZKOWSKI 2014; WIERZBICKI 2004).

Cechy istotne z punktu widzenia doboru naturalnego mogą być dziedziczone epigenetycznie z pokolenia na pokolenie (RAPP, WENDEL 2005). Istotną cechą dziedziczenia epigenetycznego jest potencjalna możliwość regulacji takiego dziedziczenia w odpowiedzi na warunki środowiska. Oznacza to, że w normalnych warunkach preferowane jest utrzymywanie stałego, zoptymalizowanego fenotypu. Jednakże, gdy warunki środowiskowe ulegają zmianie, pożądane jest zwiększenie zmienności fenotypowej, która staje się podstawą adaptacji do nowych warunków (NICOTRA I IN. 2010). Kolejną istotną cechą dziedziczenia epigenetycznego jest fakt, że istnieje możliwość utrwalenia cech nabytych. Może zatem dochodzić do sytuacji, kiedy w odpowiedzi na stan środowiska ustanawiany jest pewien konkretny wzór ekspresji genów odpowiedzialny za określone przystosowania fizjologiczne lub rozwojowe danych organizmów. Taki wzór ekspresji genów może następnie zostać epigenetycznie utrwalony (RAPP, WENDEL 2005; WIERZBICKI 2004).

Badania innych badaczy pokazują, że w warunkach stresowych może dochodzić do znacznego zwiększenia zmienności fenotypowej, co z kolei przyspiesza proces adaptacji (CHINNUSAMY, ZHU 2009; FINNEGAN 2002; GRATIVOL I IN. 2012; NICOTRA I IN. 2010; RAPP, WENDEL 2005). Dobrym przykładem jest tu np. wytwarzanie antocyjanów. Są one produkowane w liściach m.in. w odpowiedzi na nadmiar światła, zbyt wysoką lub niską temperaturę oraz wystąpienie stresu osmotycznego. Zwiększona produkcja antocyjanów w odpowiedzi na różne rodzaje stresu jest odwracalnym, plastycznym mechanizmem ochrony aparatu fotosyntetycznego. Jest to także doskonały przykład zachodzenia zjawisk epigenetycznych i możliwości uzyskania zróżnicowanych fenotypów bez zmian w sekwencji

DNA (CHINNUSAMY, ZHU 2009; GRATIVOL I IN. 2012; NICOTRA I IN. 2010; CHALKER-SCOTT 1999; STEYN I IN. 2002), co przedstawiono na FIGURZE 73.

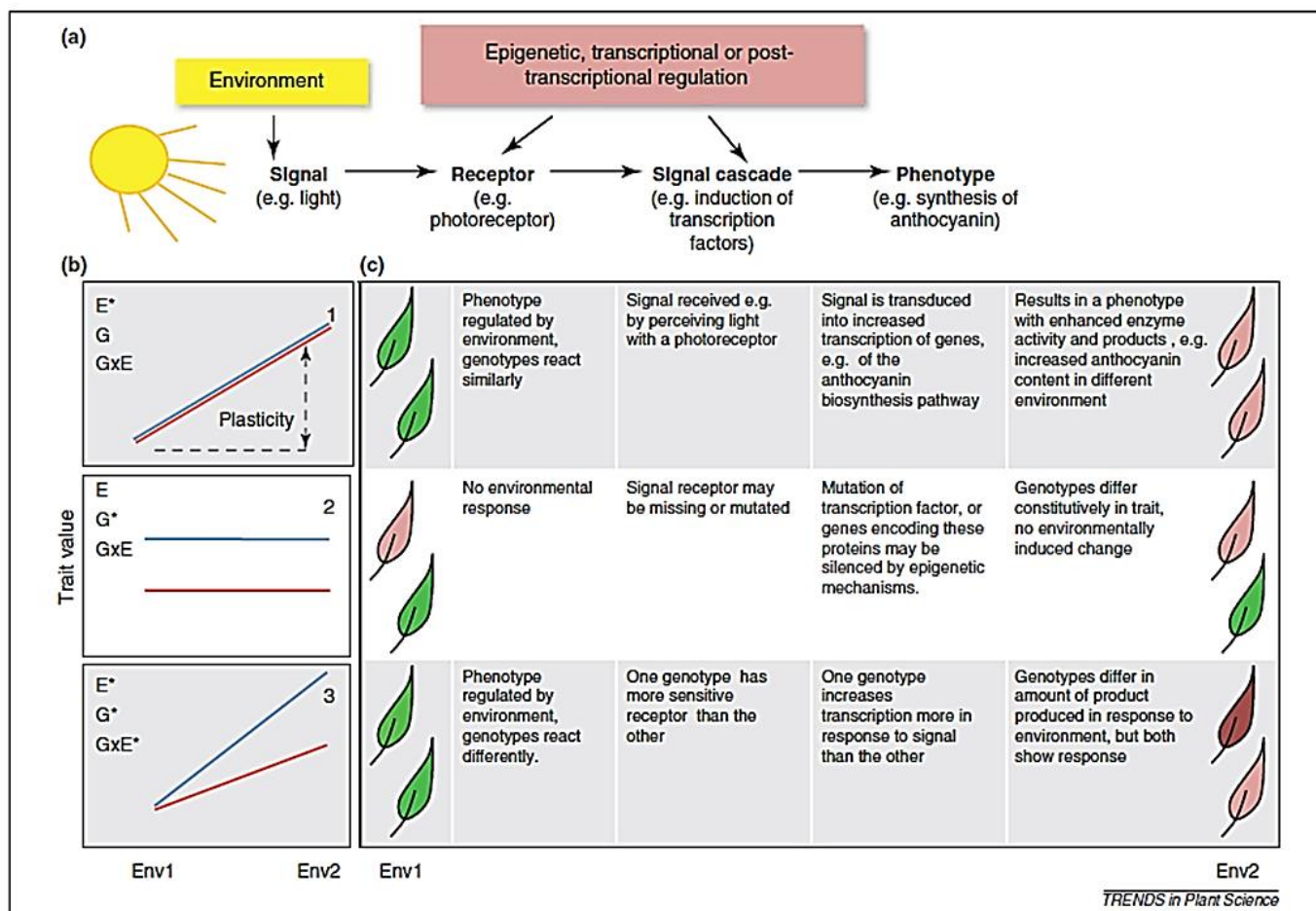


FIGURA 73. Schemat przedstawiający produkcję antocyjanów w odpowiedzi na stres środowiskowy (NICOTRA I IN. 2010), ilustrujący:

- (A) Punkty w mechanizmie molekularnym, które przekształcają sygnał środowiskowy (w tym przypadku nadmiar światła) w fenotyp.
- (B) Normy reakcji różnych genotypów na stres środowiskowy opisywany w literaturze ewolucyjnej i ekologicznej. Niebieskie i czerwone linie ilustrują normy reakcji dwóch różnych genotypów odpowiadających na zmianę warunków środowiskowych. Symbolem Env1 oznaczono środowisko o słabym natężeniu światła, natomiast symbolem Env2 oznaczono środowisko o wysokim natężeniu światła. Zakres zmian fenotypowych w odpowiedzi na sygnał środowiskowy jest fenotypową plastycznością danego gatunku. Gwiazdki (*) na schemacie wskazują reakcję roślin (produkcję antocyjanów) w sytuacjach, w których wystąpił znaczący wpływ samego środowiska (E*) lub samego genotypu (G*) oraz sytuację, gdzie obserwujemy zarówno znaczący wpływ środowiska, jak i genotypu (GxE*).
- (C) Prawdopodobne przykłady mechanizmów leżących u podstaw przypadków przedstawionych w panelach 1-3 (patrz punkt: B) podano osobno dla każdego punktu na ścieżce sygnałowej (patrz punkt: A). Liście po lewej i prawej stronie reprezentują fenotypy odpowiednio w środowisku o słabym natężeniu światła (Env1) i środowisku o silnym natężeniu światła (Env2).

Na panelu pierwszym mamy sytuację, gdy rośliny na skutek stresu środowiskowego (zwiększenie natężenia światła) reagują tak samo – produkując antocyjany. Przykład ten obrazuje zakres plastyczności fenotypowej roślin w różnych środowiskach (FIG. 73). Przez plastyczność fenotypową rozumiemy zdolność jednego genotypu do wytworzenia różnych fenotypów, w zależności od panujących warunków środowiskowych. Z kolei, plastyczność adaptacyjna to plastyczność fenotypowa, która zwiększa ogólne dostosowanie genotypu (NICOTRA I IN. 2010). Na drugim panelu mamy przykład, gdy rośliny od początku różniły się genotypem a przez to i fenotypem – charakteryzował je różny poziom antocyjanów w liściach. Gdy czynnik środowiskowy (zwiększenie natężenia światła) nie jest wystarczająco silny i nie reguluje fenotypu, to nie obserwujemy reakcji roślin i zwiększenia produkcji

antocyjanów. Rośliny wyglądają tak samo, jak przed wystąpieniem czynnika stresowego (FIG. 73). Trzeci panel przedstawia dla nas sytuację najciekawszą, kiedy to fenotyp jest regulowany przez środowisko, zaś genotypy roślin reagują niejednakowo, lecz z różną intensywnością. W tym przypadku rośliny po zwiększeniu natężenia światła różnią się ilością produktu (antocyjanów) wytwarzanego w odpowiedzi na sygnał środowiskowy, jednak w obu przypadkach obserwujemy reakcje na stres – czyli zwiększenie poziomu antocyjanów w liściach (FIG. 73).

Zatem obserwowaną zwiększoną zawartość antocyjanów w populacji *G. robertianum* z Walił w porównaniu do reszty populacji torowych i leśnych, przy braku różnic genetycznych, jednak utrwaloną w kolejnym pokoleniu, można tłumaczyć zajściem procesów o naturze epigenetycznej. Podobna sytuacja mogła wystąpić w przypadku zmniejszonych rozmiarów całych roślin i blaszek liściowych roślin z populacji z Walił. Ponieważ zmiany epigenetyczne mogą zachodzić znacznie szybciej niż zmiany oparte na sekwencjach DNA oraz dlatego, że wykazano, że mogą zachodzić na skutek wystąpienia różnych stresów środowiskowych, odgrywają one istotną rolę dostosowaniu roślin do zmieniającego się środowiska (NICOTRA I IN. 2010). Nowe permutacje przestrzennych i czasowych wzorców ekspresji genów można osiągnąć za pomocą zestawu mechanizmów epigenetycznych, nawet przy całkowitym braku zmienności genetycznej. Reakcje epigenetyczne przy kontakcie organizmów z czynnikiem stresowym mogą generować ogromne ilości ukrytej zmienności w ekspresji genów, które mogą być testowane na drodze doboru naturalnego w ewolucyjnej skali czasu (RAPP, WENDEL 2005).

Warto zastanowić się w jaki sposób można badać zachodzenie zjawisk epigenetycznych. Techniki rutynowo stosowane w badaniach ewolucyjnych do badania zmienności, takie jak: AFLP, RFLP, izoenzymy, sekwencjonowanie DNA, czy mikrosatelity nie nadają się do oceny zmienności powstałej na skutek zachodzenia zjawisk epigenetycznych (RAPP, WENDEL 2005). Zatem stosowana w niniejszych badaniach standardowa wersja metody AFLP do oceny zmienności genetycznej roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych nie była odpowiednim narzędziem, jeżeli obserwowane w fenotypie różnice pomiędzy populacjami miały podłoże epigenetyczne. Do badania zmienności epigenetycznej należy stosować specyficzne metody, takie jak na przykład MS-AFLP (ang. *methylation-sensitive AFLP*), czyli metodę AFLP wrażliwą na metylację lub też należy stosować badania ekspresji genów (RAPP, WENDEL 2005). Zmienność epigenetyczna jest zjawiskiem powszechnym u roślin. Wiele badań dokumentuje międzyosobniczą zmienność epigenetyczną w wielu różnych grupach roślin (ASHIKAWA 2001; CERVERA I IN. 2002; KNOX, ELLIS 2001; LIU, WENDEL 2003; Riddle, Richards 2002; WANG I IN. 2004).

Podsumowując, nowa forma roślin *G. robertianum* z populacji torowej z Walił-Stacji, mogła powstać na skutek wystąpienia zjawisk epigenetycznych. Zaś do jej powstania najprawdopodobniej przyczyniło się występowanie na torach kolejowych licznych czynników stresowych, takich jak insolacja, niedobór wody i soli mineralnych, czy wreszcie oprysk herbicydami. Jest to doskonały przykład zachodzenia początkowego etapu procesu mikroewolucji u gatunków występujących na siedliskach antropogenicznie zmienionych, którymi bez wątpienia są tory kolejowe.

VI. WNIOSKI

- Wykazano, że gatunek o takiej biologii, jak *G. robertianum* pomimo niekorzystnych warunków środowiskowych (niedoboru wody, insolacji i oprysków herbicydem) jest zdolny przetrwać na torach kolejowych.
- Na torach kolejowych w Waliłach-Stacji w 2008 r. występowała odmienna forma roślin *G. robertianum*. Rośliny z tej populacji były mniejsze, miały dużo mniejsze i ciemniejsze blaszki liściowe o większej zawartości antocyjanów niż rośliny z innych przebadanych populacji torowych i leśnych. Rośliny te charakteryzowała także podwyższona tolerancja na insolację, suszę i oprysk herbicydem Roundup.
- Wśród czynników selekcyjnych, które przyczyniły się do powstania odmiennej formy roślin *G. robertianum* na torach kolejowych w Waliłach można wymienić stres radiacyjny, niedobór wody oraz stres herbicydowy.
- W ramach przeprowadzonych badań genetycznych nie wykazano, aby populacja *G. robertianum* z miejscowości Waliły-Stacja pod względem genetycznym różniła się od roślin z innych populacji torowych i leśnych. Nie wykazano także różnic genetycznych pomiędzy roślinami *G. robertianum* z populacji torowych i roślinami z populacji leśnych.
- Rangę taksonomiczną roślin z populacji torowej z Walił należy określić jako „forma”. Jest to kategoria systematyczna niższa od odmiany. Do kategorii forma zaliczane są osobniki rzadko występujące w populacjach danego gatunku, wyróżniające się od pozostałych osobników pojedynczymi cechami, zaś ich występowanie jest związane najczęściej jedynie z niewielkimi modyfikacjami genetycznymi.
- Nowa forma roślin *G. robertianum* z Walił-Stacji nie była trwała. Wykazano że, charakterystyczne cechy obserwowane u roślin z Walił zanikły na przestrzeni około 5 lat, prawdopodobnie na skutek braku, któregoś z czynników stresowych (zmniejszone użytkowanie linii kolejowej, brak oprysków herbicydem).

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy doktorskiej stanowią doskonały przykład zachodzenia początkowego etapu procesu mikroewolucji u roślin na obszarach antropogenicznie przekształconych.

VII. LITERATURA

1. ABRATOWSKA A., WĄSOWICZ P., BEDNAREK P., TELKA J., WIERZBICKA M. 2012. Morphological and genetic distinctiveness of the metallicolous and non-metallicolous populations of *Armeria maritima* s. l. (Plumbaginaceae) in Poland. *Plant Biology* 14(4): 586–595.
2. ADAMCZEWSKI K. 2014. Odporność chwastów na herbicydy. PWN, Warszawa.
3. ADAMCZEWSKI K., DOBRZAŃSKI K. 2012A. Future for weed sciences in changing agriculture. *Progress in Plant Protection* 52(4): 867–878. <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2012-149>
4. ADAMCZEWSKI K., DOBRZAŃSKI K. 2012B. The weed fitness in herbicide resistance research. *Progress in Plant Protection* 52 (3): 549–555. <http://dx.doi.org/10.14199/ppp-2012-095>
5. ADAMCZEWSKI K., KIERZAK R., MATYSIAK K. 2011. Przysmiotno kanadyjskie (*Conyza canadensis* L.) odporne na glifosat. *Progress in Plant Protection* 51(4): 1675–1682.
6. AEDO C. 2000. The genus *Geranium* L. (Geraniaceae) in North America. I. Annual species. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 58(1): 39–82.
7. AGARWAL M., SHRIVASTAVA N., PADH H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant cell reports* 27(4): 617–631.
8. ALARCÓN M., VARGAS P., SÁEZ L., MOLERO J., ALDASORO J.J. 2012. Genetic diversity of mountain plants: Two migration episodes of Mediterranean *Erodium* (Geraniaceae). *Molecular phylogenetics and evolution* 63(3): 866–876.
9. ALLOWAY B.J., AYRES D.C. 1999. Chemiczne podstawy zanieczyszczenia środowiska. PWN, Warszawa.
10. ANTOSIEWICZ D., WIERZBICKA M. 1999. Localization of lead in *Allium cepa* L. cells by electron microscopy. *Journal of Microscopy* 195: 139–146.
11. ASHIKAWA I. 2001. Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. *Plant Molecular Biology* 45: 31–39.
12. AVISE J.C. 2008. Markery Molekularne, historia naturalna i ewolucja. Wydawnictwa Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa.
13. BABST-KOSTECKA A. 2015. Aspekty ewolucyjne tolerancji roślin na metale ciężkie. W: WIERZBICKA M. (Red.) *Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa: 117–123.
14. BAKER H.G. 1956. *Geranium purpureum* Vill. and *G. robertianum* L. in the British flora. II. *Geranium robertianum*. *Watsonia* 3: 270–279.
15. BAKER A. J. M., PROCTOR J. 1990. The influence of cadmium, copper, lead, and zinc on the distribution and evolution of metallophytes in the British Isles. *Plant Systematics and Evolution* 173(1–2): 91–108.
16. BARCACCIA G., ALBERTINI E., FALCINELLI M. 1999. AFLP fingerprinting in *Pelargonium peltatum*: its development and potential in cultivar identification. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 74(2): 243–250.
17. BAUCOM R.S., MAURICIO R. 2004. Fitness costs and benefits of novel herbicide tolerance in a noxious weed. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(36): 13386–13390.
18. BAUMBACH H., HELLWIG F.H. 2003. Genetic variation within and among metal-tolerant and non-tolerant populations of *Armeria maritima* (Mill.) Willd. sl (Plumbaginaceae) in Central and Northeast Germany. *Plant Biology* 5(2): 186–193.
19. BAYLIS A.D. 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science* 56: 299–308.
20. BECKER M., ALBERS F. 2009. Taxonomy and phylogeny of two subgroups of *Pelargonium* section *Otidia* (Geraniaceae). 1. The *Pelargonium carnosum* complex. *Bothalia* 39(1): 73–85.
21. BERGELSON J., PURRINGTON C.B., PALM C.J., LOPEZ-GUTIERREZ J.C. 1996. Costs of resistance: a test using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 263(1377): 1659–1663.
22. BERTIN R.I. 2001. Life cycle, demography, and reproductive biology of Herb Robert (*Geranium robertianum*). *Rhodora* 103: 96–116.
23. BIEZA K., LOIS R. 2001. An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics. *Plant Physiology* 126(3): 1105–1115.

24. BINKIEWICZ P. 2005. Infrastruktura kolejowa a krajobraz na wybranych przykładach z Dolnego Śląska. W: SZPONAR A., HORSKA-SCHWARZ S. (Red.) Biuletyn Polskiej Asocjacji Ekologii Krajobrazu. Problemy Ekologii Krajobrazu 17: 205–215.
25. BLIGNAUT M., ELLIS A.G., LE ROUX J.J. 2013. Towards a transferable and cost-effective plant AFLP protocol. PloS one 8(4): e61704.
26. BOARD M. 2001. A comparison of the growth and flowering response of two related *Geranium* species grown in conditions of sun, partial shade and shade. Unpublished undergraduate thesis. Open University, Milton Keynes, UK.
27. BOBRYK N. 2015. Spreading and accumulation of heavy metals in soils of railway-side areas. Visnyk of Dnipropetrovsk University. Biology, ecology 23(2): 183–189.
28. BROOKES A.J. 1999. The essence of SNPs. Gene 234: 177–186.
29. BÖRJESSON E., TORSTENSSON L. 2000. New methods for determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid in water and soil. Journal of Chromatography A 886: 207–216.
30. BURKHARDT M., ROSSIA L., BOLLERA M. 2008. Diffuse release of environmental hazards by railways. Desalination 226: 106–113.
31. BURIÁNEK V., NOVOTNÝ R., HELLEBRANDOVÁ K., ŠRÁMEK V. 2013. Ground vegetation as an important factor in the biodiversity of forest ecosystems and its evaluation in regard to nitrogen deposition. Journal of Forest Science 59(6): 238–252.
32. CAMPBELL W.F., EVANS J.O., REED S.C. 1976. Effects of Glyphosate on Chloroplast Ultrastructure of Quackgrass Mesophyll Cells. Weed Science 24 (1): 22–25.
33. CERVERA M.T., RUIZ-GARCIA L., MARTINEZ-ZAPATER J. 2002. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. Molecular Genetics and Genomics 268(4): 543–552.
34. CEDERLUND H., STENSTRÖM J. 2004. Microbial biomass and activity on railway track and embankments. Pest Management Science 60: 550–555.
35. CHACHALIS D., REDDY K.N., ELMORE C.D. 2001A. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate. Weed Science 49: 156–163.
36. CHACHALIS D., REDDY K.N., ELMORE C.D., STEELE M.L. 2001B. Herbicide efficacy, leaf structure, and spray droplet contact angle among *Ipomoea* species and small flower morning glory. Weed Science 49: 628–634.
37. CHADOWÁ D., SALAVA J., MARTINCOVÁ O., CVIKROVÁ M. 2009. Horseweed with Reduced Susceptibility to Glyphosate Found in the Czech Republic. Journal of Agricultural and Food Chemistry 57: 6957–6961.
38. CHALKER-SCOTT L. 1999. Environmental Significance of Anthocyanins in Plant Stress Responses. Photochemistry and Photobiology 70(1): 1–9.
39. CHINNUSAMY V., ZHU J.K. 2009. Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current opinion in plant biology 12(2): 133–139.
40. CHRISTOFFERS M.J. 1999. Genetic aspects of herbicide - resistant weed management. Weed Technology 13: 647–652.
41. CIECIURA L. 1989. Techniki stosowane w mikroskopii elektronowej. PWN, Warszawa.
42. COLE D.J., CASELEY J.C., DODGE A.D. 1983. Influence of glyphosate on selected plant processes. Weed Research 23(3): 173–183.
43. COLLINS F.S., BROOKS L.D., CHAKRAVARTI A. 1998. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome research 8(12): 1229–1231.
44. DAS S.K., MONDAL T. 2014. Mode of action of herbicides and recent trends in development: A Reappraisal. International Invention Journal of Agricultural and Soil Science 2(3): 27–32.
45. DAYAN F.E., DUKE S.O., GROSSMANN K. 2010. Herbicides as Probes in Plant Biology. Weed Science 58: 340–350.
46. DZ. U. 2002 R. NR 165, POZ. 1359. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi.
47. EDWARDS K.J. 1998. Randomly amplified polymorphic DNAs (RAPDs). In Molecular tools for screening biodiversity. Springer, Netherlands: 171–175.
48. EKER S., ÖZTÜRK L., ERENOĞLU B., ROMHELD V., ÇAKMAK İ. 2006. Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. Journal of agricultural and food chemistry 54(26): 10019–10025.

49. ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP 360 SL.
50. ETYKIETA ŚRODKA ROUNDUP ULTRA 170 SL.
51. ENDRESS P.K. 2010. Synorganisation without organ fusion in the flowers of *Geranium robertianum* (Geraniaceae) and its not so trivial obdiplostemony. *Annals of Botany* 106(5): 687–695.
52. ERNST A., SAUER J., WITTIG R., NOWAK C. 2013. Local genetic structure of a montane herb among isolated grassland patches: implications for the preservation of genetic diversity under climate change. *Population ecology* 55(3): 417–431.
53. ERNST W.H. 2006. Evolution of metal tolerance in higher plants. *Forest Snow and Landscape Research* 80(3): 251–274.
54. EVANNO G., REGNAUT S., GOUDET J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology* 14(8): 2611–2620.
55. EXCOFFIER L., LISCHER H.E.L. 2010. Arlequin suite ver. 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Research* 10: 564–567.
56. EXCOFFIER L., SMOUSE P.E., QUATTRO J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 86: 991–1000.
57. FALINSKA K., PIROZNIKOV E. 1983. Ecological structure of *Geranium robertianum* L. populations under natural conditions and in the garden. *Ekologia Polska* 31: 93–121.
58. FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567–1587.
59. FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574–578.
60. Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. Distributed by the author. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
61. FERNANDEZ J.V., ODERO D.C., MACDONALD G.E., FERRELL J., GETTYS L.A. 2015. Confirmation, Characterization, and Management of Glyphosate-Resistant Ragweed *Parthenium hysterophorus* L. in the Everglades Agricultural Area of South Florida. *Weed Technology* 29(2): 233–242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1614/WT-D-14-00113.1>
62. FINNEGAN E.J. 2002. Epialleles – a source of random variation in times of stress. *Current opinion in plant biology* 5(2): 101–106.
63. FORMAL-PIENIAK B., WYSOCKI C. 2010. Flora nasypu nieużytkowanej linii kolejowej w okolicach Sokołowa Podlaskiego. *Woda-Środowisko-Obszary Wiejskie* 10: 85–94.
64. FOX R.D., REICHARD D.L., BRAZEE R.D. 1992. A video analysis system for measuring droplet motion. *Applied Engineering in Agriculture* 8(2): 153–157.
65. FREELAND J.R. 2008. *Ekologia Molekularna*. PWN, Warszawa.
66. FULEKI T., FRANCIS F.J. 1968. Quantitative methods for anthocyanins. 2. Determination of total anthocyanin and degradation index for cranberry juice. *Food Science* 33: 78–83.
67. GALERA H., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., WIERZBICKA M., JARZYNA I., WILKOMIRSKI B. 2014. Structure of the flora of railway areas under various kinds of anthropopression. *Polish Botanical Journal* 59: 121–130.
68. GALERA H., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., WIERZBICKA M., WILKOMIRSKI B. 2011. Encroachment of forest species into operating and abandoned railway areas in north-eastern Poland. *Plant Biosystems* 145: 23–36.
69. GALERA H., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., WIERZBICKA M., WILKOMIRSKI B. 2012. Directions of changes in the flora structure in the abandoned railway areas. *Ecological Questions* 16: 29–39.
70. GIERAK A. 1995. Zagrożenie środowiska produktami ropopochodnymi. *Ochrona środowiska* 2: 31–34. Wydawnictwo Oddziału Dolnośląskiego Polskiego Zrzeszenia Inżynierów i Techników Sanitarnych, Wrocław.
71. GIESY J.P., DOBSON S., SOLOMON K. R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: *Reviews of environmental contamination and toxicology* 167: 35–120, Springer New York.
72. GODÉ C., DECOMBEIX I., KOSTECKA A., WASOWICZ P., PAUWELS M., COURSEAUX A., SAUMITOU-LAPRADE P. 2012. Nuclear microsatellite loci for *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae), a model species to study plant adaptation to heavy metals. *American Journal of Botany* 99(2): e49–e52.
73. GOMES M.P., LE MANAC'H S.G., MACCARIO S., LABRECQUE M., LUCOTTE M., JUNEAU P. 2016. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 130: 65–70.

74. GOVE B., POWER S.A., BUCKLEY G.P., GHAZOUL J. 2007. Effects of herbicide spray drift and fertilizer overspread on selected species of woodland ground flora: comparison between short-term and long-term impact assessments and field surveys. *Journal of Applied Ecology* 44: 374–384.
75. GRATIVOL C., HEMERLY A.S., FERREIRA P.C.G. 2012. Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1819(2): 176–185.
76. GRIME J.P., HODGSON J.G., HUNT R. 1988. *Comparative plant ecology. A functional approach to common british species.* Unwin Hyman, London, UK.
77. GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., CHAUMEIL P., LÉGER P., LEPAIS O., LEPOITTEVIN C., MALAUSA T., REVARDEL E., F. SALIN, PETIT R.J. 2011. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular ecology resources* 11(4): 591–611.
78. HAMOUZOVÁ K., HOLEC J., TŮMOVÁ P., SOUKUP J. 2012. Glyphosate-Tolerant Horseweed found on the railway tracks in the Czech Republic. In: *International Workshop on Glyphosate Weed Resistance: European Status and Solutions.*
79. HAMOUZOVÁ K., SALAVA J., CHODOVÁ D. 2009. Testing of susceptibility of horseweed (*Conyza canadensis* L. (Cronq.)) to glyphosate after its long term use in two railway stations. *Herbologia* 10(2): 59–64.
80. HARDY O.J. 2003. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterization of isolation-by-distance processes using dominant genetic markers. *Molecular Ecology* 12(6): 1577–1588.
81. HARTL D.L., CLARK A.G. 1997. *Principles of population genetics.* Third edition. Sunderland: Sinauer associates.
82. HATTERMAN-VALENTI H.M., PITT Y. A., OWEN M.D.K. 2006. Effect of environment on giant foxtail (*Setaria faberi*) leaf wax and fluazifop-P absorption. *Weed Science* 54: 607–614.
83. HAYASHI E., CHI H.C., BOYER S.K., STILL D.W. 2005. Amplified fragment length polymorphism protocol for plant science on CEQ series genetic analysis system. Application Information A-2015A. Beckman Coulter Inc., California.
84. HENDRY A.P., KINNISON, M.T. 2001. An introduction to microevolution: rate, pattern, process. *Genetica* 112(1): 1–8.
85. HILDEBRANDT U., HOEF-EMDEN K., BACKHAUSEN S., BOTHE H., BOŽEK M., SIUTA A., KUTA E. 2006. The rare, endemic zinc violets of Central Europe originate from *Viola lutea* Huds. *Plant Systematics and Evolution* 257(3–4): 205–222.
86. HŁAWICZKA S. 2008. *Metale ciężkie w środowisku. Prace Instytutu Ekologii Terenów Uprzemysłowionych.* Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok.
87. HUBISZ M.J., FALUSH D., STEPHENS M., PRITCHARD J.K. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular ecology resources* 9(5): 1322–1332.
88. HUSON D.H., BRYANT D. 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution* 23(2): 254–267. Oprogramowanie dostępne w: www.splitsite.org
89. IWASAKI M., PASZKOWSKI J. 2014. Epigenetic memory in plants. *The EMBO journal* 33(18): 1987–1998.
90. JAENISCH R., BIRD A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature genetics* 33: 245–254.
91. KABATA-PENDIAS A., PENDIAS H. 1999. *Biogeochemia pierwiastków śladowych.* PWN, Warszawa.
92. KABATA-PENDIAS A., PIOTROWSKA M., MOTOWICKA-TERELAK T., MALISZEWSKA-KORDYBACH B., FILIPIAK K., KRAKOWIAK A., PIETRUCH C. 1995. *Podstawy oceny chemicznego zanieczyszczenia gleb. Metale ciężkie, siarka i WWA. Biblioteka monitoringu środowiska.*
93. KACPERSKA A. 2002. Reakcje roślin na abiotyczne czynniki stresowe. W: KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.), *Fizjologia roślin.* Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 612–678.
94. KARTA CHARAKTERYSTYKI ŚRODKA ROUNDUP 360 SL.
95. KENDAL W. S. 2003. An exponential dispersion model for the distribution of human single nucleotide polymorphisms. *Molecular biology and evolution* 20(4): 579–590.
96. KISHORE G.M., PADGETTE S.R., FRALEY R.T. 1992. History of Herbicide – Tolerant Crops, Methods of Development and Current State of the Art – Emphasis on Glyphosate Tolerance. *Weed Technology* 6: 626–634.
97. KITCHEN L.M., WITT W.W., RIECK C.E. 1981. Inhibition of chlorophyll accumulation by glyphosate. *Weed Science* 29(4): 513–516.
98. KLIMEK B. 2011. *Analiza fitochemiczna roślinnych substancji leczniczych.* Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, Łódź.

99. KNOX M., ELLIS T. 2001. Stability and inheritance of methylation states at PstI sites in *Pisum*. *Molecular Genetics and Genomics* 265: 497–507.
100. KOPCEWICZ J. 2012. Podstawy biologii roślin. Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa.
101. KORNAŚ J., LEŚNIEWSKA I., SKRYWANEK A. 1959. Obserwacja nad florą linii kolejowych i dworców towarowych w Krakowie. *Fragmenta Floristica et Geobotanica* 5(2): 199–216.
102. KRYSZAK A., KRYSZAK J., CZEMKO M., KALBARCZYK M. 2006. Roślinność nasypów wybranych szlaków kolejowych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu Rolnictwo* 545: 157–164.
103. KUDSK P., STREIBIG J.C. 2003. Herbicides – a two-edged sword. *Weed Research* 43: 90–102.
104. KUTA E., JĘDRZEJCZYK-KORYCIŃSKA M., CIEŚLAK E., ROSTAŃSKI A., SZCZEPANIAK M., MIGDALEK G., WĄSOWICZ P., SUDA J., COMBIK M., SŁOMKA A. 2014. Morphological versus genetic diversity of *Viola reichenbachiana* and *V. riviniana* (sect. *Viola*, *Violaceae*) from soils differing in heavy metal content. *Plant Biology* 16(5): 924–934.
105. KWIATKOWSKA M., JAROSIEWICZ P., BUKOWSKA B. 2013. Glifosat i jego preparaty – toksyczność, narażenie zawodowe i środowiskowe. *Medycyna Pracy* 64: 717–729.
106. LARCHER W. 1987. Stress by pflanzen. *Naturwissenschaften* 74: 158–167.
107. LEAPER C., HOLLOWAY P.J. 2000. Adjuvants and glyphosate activity. *Pest Management Science* 56: 313–319.
108. LEFÈVRE C., VERNET P. 1990. Microevolutionary processes on contaminated deposits. W: SHAW A.J. (Red.) *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida: 285–299.
109. LEI M., ZHU C., LIU Y., KARTHIKEYAN A.S., BRESSAN R.A., RAGHOTHAMA K.G., LIU D. 2011. Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 189(4): 1084–1095.
110. LEWAK S. 2002. Spoczynek nasion. W: KOPCEWICZ J., LEWAK S. (red.), *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 560–563.
111. LI Y.C., KOROL A.B., FAHIMA T., BEILES A., NEVO E. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular ecology* 11(12): 2453–2465.
112. LITWIN J.A. 1999. Podstawy technik mikroskopowych. Wydawnictwo Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków.
113. LIU B., WENDEL J. 2003. Epigenetic phenomena and the evolution of plant allopolyploids. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 365–379.
114. LIU Z.Q. 2003. Characterisation of glyphosate uptake into grass species. *Australian journal of agricultural research* 54(9): 877–884.
115. LIU Z. 2004. Effects of surfactants on foliar uptake of herbicides – a complex scenario. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 35: 149–153.
116. LIU H., CHEN L.P., AI Y.W., YANG X., YU Y.H., ZUO Y.B., FU G.Y. 2009. Heavy metal contamination in soil alongside mountain railway in Sichuan, China. *Environmental Monitoring and Assessment* 152: 25–33.
117. LYNCH M., MILLIGAN B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91–99.
118. MALAWSKA M., WILKOMIRSKI B. 1999. An analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) content in soil and plant leaves (*Taraxacum officinale*) in the area of the railway junction Ława Główna. *Toxicological and Environmental Chemistry* 70: 509–515. DOI:10.1080/02772249909358773
119. MALAWSKA M., WILKOMIRSKI B. 2001A. Accumulation rate of polychlorinated biphenyls (PCBs) in Dandelion (*Taraxacum officinale*) in the conditions of soil contamination with oil derivatives. *Roczniki PZH* 52 (4): 295–311.
120. MALAWSKA M., WILKOMIRSKI B. 2001B. An analysis of soil and plant (*Taraxacum officinale*) contamination with heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the area of the railway junction Ława Główna, Poland. *Water, Air and Soil Pollution* 127: 339–349.
121. MALONE J., COOK A., WU H., HASHEM A., PRESTON C. 2012. Management of glyphosate resistant weeds in non-agricultural areas. In: 18th Australasian Weeds Conference: “Developing Solutions to Evolving Weed Problems”, 8-11 October 2012, The Sebel and Citigate Albert Park, Melbourne, Victoria, Australia: 184–186.
122. MANAHAN S.E. 2006. Toksykologia środowiska. Aspekty chemiczne i biochemiczne. PWN, Warszawa.
123. MANCINELLI A.L., HOFF A.M., COTTRELL M. 1988. Anthocyanin production in Chl-rich and Chl-poor seedlings. *Plant physiology* 86(3): 652–654.

124. MATTHES M.C., DALY A., EDWARDS K.J. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). In: KARP A., INGRAM D.S., ISAAC P.G., INGRAM D.S. (Eds.). *Molecular Tools for Screening Biodiversity: Plants and Animals*. Chapman & Hall, London: 183–190.
125. MARTIN M.C. 1965. An ecological life history of *Geranium maculatum*. *American midland naturalist* 73(1): 111–149.
126. MĘTRAK M., CHMIELEWSKA M., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., WILKOMIRSKI B., STASZEWSKI T., SUSKA-MALAWSKA M. 2015. Does the Function of Railway Infrastructure Determine Qualitative and Quantitative Composition of Contaminants (PAHs, Heavy Metals) in Soil and Plant Biomass? *Water Air and Soil Pollution* 226: 253. DOI: 10.1007/s11270-015-2516-1
127. MICHALSKI S.G., DURKA W. 2012. Assessment of provenance delineation by genetic differentiation patterns and estimates of gene flow in the common grassland plant *Geranium pratense*. *Conservation Genetics* 13(2): 581–592.
128. MICHALSKI S.G., DURKA W., JENTSCH A., KREYLING J., POMPE S., SCHWEIGER O., WILLNER E., BEIERKUHNLEIN C. 2010. Evidence for genetic differentiation and divergent selection in an autotetraploid forage grass (*Arrhenatherum elatius*). *Theoretical and Applied Genetics*, 120(6) 1151–1162.
129. MORET S., PURCARO G., CONTE L.S. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) content of soil and olives collected in areas contaminated with creosote released from old railway ties. *Science of the Total Environment* 386: 1–8.
130. MORIN P.A., LUIKART G., WAYNE R.K. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 19(4): 208–216.
131. MOTOOKA P., CHING L., NAGAI G. 2002. *Herbicide Weed Control Methods for Pastures and Natural Areas of Hawaii*. Weed Control 8.
132. MUELLER U.G., WOLFENBARGER L.L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology & Evolution* 14(10): 389–394.
133. MULLIS K.B., FALOONA F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155: 335–350.
134. NAGAI E., TERAMOTO S., SHIMONO Y., TOMINAGA T. 2015. Mechanisms of glyphosate resistance in goosegrass and horseweed in Japan. The 54th WSSJ Annual Meeting Abstracts 44, in Japanese.
135. NANDULA V.K., REDDY K.N., DUKE S.O., POSTON D.H. 2005. Glyphosate-resistant weeds: current status and future outlook. *Outlooks on Pest Management* 16: 183–187.
136. NAVRATILOVA S., WINKLER J. 2014. Structure of weed species on railway. Conference MendelNet 2014, 19-20th November, Brno. Conference materials: 76–80.
web2.mendelu.cz/af_291_mendelnet/mendelnet2014/articles/50_navratilova_1009.pdf
137. NEI M., LI W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76(10): 5269–5273.
138. NICOTRA A.B., ATKIN O.K., BONSER S.P., DAVIDSON A.M., FINNEGAN E.J., MATHESIUS U., POOT P., PURUGGANAN M.D., RICHARDS C.L., VALLADARES F., VAN KLEUNEN M. 2010. Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends in plant science* 15(12): 684–692.
139. NISHIDA S., AZUMA H., NAIKI A., OGAWA M. 2012. Molecular Phylogenetic Analyses of *Geranium robertianum* Populations Recently Found in Japan. *APG: Acta phytotaxonomica et geobotanica* 62(2): 79–87.
140. NEUHAUS-URL G., NEUHAUS G. 1993. The use of the nonradioactive digoxigenin chemiluminescent technology for plant genomic Southern blot hybridization: a comparison with radioactivity. *Transgenic Research* 2: 115–120.
141. NOWAK Z., GRUSZCZYŃSKA J. 2007. *Wybrane techniki i metody analizy DNA*. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
142. O'NEILL P. 1997. *Chemia środowiska*. PWN, Warszawa.
143. ORITA M., IWAHANA H., KANAZAWA H., HAYASHI K., SEKIYA T. 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(8): 2766–2770.
144. PAPA R., TROGGIO M., AJMONE-MARSAN P., NONNIS MARZANO F. 2005. An improved protocol for the production of AFLP™ markers in complex genomes by means of capillary electrophoresis. *Journal of animal breeding and genetics* 122(1): 62–68.

145. PARREIRA M.C., LEMOS L.B., PORTUGAL J., ALVES P.L.D.C.A. 2015. Effects of desiccation with glyphosate on two common bean cultivars: physiology and cooking quality of the harvested product. *Australian Journal of Crop Science* 9(10): 925.
146. PEDRO L., CAMPOS P., PAIS M.S. 1990. Morphology, ontogeny and histochemistry of secretory trichomes of *Geranium robertianum* (Geraniaceae). *Nordic Journal of Botany* 10: 501–509.
147. PEREZ-JONES A., PARK KEE-WOONG, POLGE N., COLQUHOUN J., MALLORY-SMITH C.A. 2007. Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. *Planta* 226: 395–404.
148. PIENIAŻEK D., BUKOWSKA B., DUDA W. 2003. Glifosat – nietoksyczny pestycyd? *Medycyna Pracy* 54: 579–583.
149. PILOT M., RUTKOWSKI R., MALEWSKA A., MALEWSKI T. 2005. Zastosowanie metod molekularnych w badaniach ekologicznych. Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Warszawa.
150. PRACZYK T., SKRZYPCZAK G. 2004. *Herbicydy*. Państwowe Wydawnictwo Rolne i Leśne, Poznań.
151. PRITCHARD J.K., STEPHENS M., DONNELLY P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
152. PUY J., DVOŘÁKOVÁ H., CARMONA C.P., DE BELLO F., HIESALU I., LATZEL V. 2018. Improved demethylation in ecological epigenetic experiments: Testing a simple and harmless foliar demethylation application. *Methods in Ecology and Evolution* 9(3): 744–753.
153. RAPP R.A., WENDEL J.F. 2005. Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168(1): 81–91.
154. RASZKA A., ZIEMBIŃSKA A., WIECHETEK A. 2009. Metody i techniki biologii molekularnej w badaniach środowiskowych. *Środowisko Czasopismo Techniczne* 2-Ś/2009, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej.
155. REYNOLDS E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
156. REYNOLDS J., WEIR B.S., COCKERHAM C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. *Genetics* 105: 767–779.
157. REICHARD D.L., BRAZEE R.D., BUKOVAC M.J., FOX R.D. 1986. A system for photographically studying droplet impaction on leaf surfaces. *Transactions of the ASAE* 29(3): 707–713.
158. RIDDLE N.C., RICHARDS E.J. 2002. The control of natural variation in cytosine methylation in *Arabidopsis*. *Genetics* 162: 355–363.
159. ROBERTS H.A., BODDRELL J.E. 1985. Seed survival and seasonal emergence in some species of *Geranium*, *Ranunculus* and *Rumex*. *Annals of Applied Biology* 107(2): 231–238.
160. RODWELL J.S. (ed.) 1991. *British Plant Communities*, Vol. 1: Woodlands and Scrub. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
161. RONIĘKIER M., CIEŚLAK E., KORBECKA G. 2008. High genetic differentiation in the alpine plant *Campanula alpina* Jacq. (Campanulaceae): evidence for glacial survival in several Carpathian regions and long-term isolation between the Carpathians and the Alps. *Molecular Ecology* 17(7): 1763–1775.
162. SAITOU N., NEI M. 1987. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406–425.
163. SCHLÜTER P.M., HARRIS S.A. 2006. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 6: 569–572.
164. SCHÖNSWETTER P., TRIBSCH A. 2005. Vicariance and dispersal in the alpine perennial *Bupleurum stellatum* L. (Apiaceae). *Taxon* 54(3): 725–732.
165. SCHUETTE J. 1998. Environmental fate of glyphosate. Environmental Monitoring & Pest Management Department of Pesticide Regulation Sacramento, CA, USA.
166. SCHWEINSBERG F., ABKE W., RIETH K., ROHMANN U., ZULLEI-SEIBERT N. 1999. Herbicide use on railway tracks for safety reasons in Germany? *Toxicology Letters* 107: 201–205.
167. SCRIBNER K.T., PEARCE J.M. 2000. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. *Molecular methods in ecology*: 235–273.
168. SEŃCZUK W. 2002. *Toksykologia*. Wydanie IV. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
169. SHERRICK S.L., HOLT H.A., DAN HESS F. 1986. Absorption and Translocation of MON 0818 Adjuvant in Field Bindweed (*Convolvulus arvensis*). *Weed Science* 6: 817–823.
170. SHISHKIN B.K., BOBROV E.G. 1974. *Flora of the USSR*. Vol. XI. *Geraniales, Sapindales, Rhamnales*. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva-Leningrad, Russia.

171. SHRESTHA A., HANSON B.D., FIDELIBUS M.W., ALCORTA M. 2010. Growth, phenology, and intraspecific competition between glyphosate-resistant and glyphosate-susceptible horseweeds (*Conyza canadensis*) in the San Joaquin Valley of California. *Weed Science* 58: 147–153.
172. SOLECKA D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. *Acta Physiologiae Plantarum* 19(3): 257–268.
173. SOUTHERN E.M., 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* 98: 503–517.
174. STACE C.A. 1993. Taksonomia roślin i biosystematyka. Wydawnictwa Naukowe PWN, Warszawa.
175. STATSOFT, INC. 2014. STATISTICA (data analysis software system), version 12. www.statsoft.com
176. STEARNS S.C., HOEKSTRA R.F. 2000. Evolution. An Introduction. Oxford University Press, Oxford.
177. STEFANOWICZ-HAJDUK J. 2008. Zróżnicowanie genetyczne oraz ocena aktywności biologicznej metabolitów wtórnych *Paris quadrifolia* L. i *Polygonatum multiflorum* (L.) All. Praca doktorska. Katedra i Zakład Biologii i Botaniki Farmaceutycznej, Wydział Farmaceutyczny Akademii Medycznej, Gdańsk.
178. STEINMANN H.H., DICKEDUISBERG M., THEUVSEN L. 2012. Uses and benefits of glyphosate in German arable farming. *Crop Protection* 42: 164–169.
179. STEYN W.J., WAND S.J.E., HOLCROFT D.M., JACOBS G. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* 155: 349–361.
180. SZTUBA-SOLIŃSKA J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. *Kosmos* 54 (2-3): 227–239.
181. ŚWIĘS F., MAJKUT A. 2006. Rzadsze rośliny naczyniowe terenów kolejowych w określonych regionach Kotliny Sandomierskiej. Cz. 1. Nizina Nadwiślańska, część północna. *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin* 61: 19–43.
182. THIERFELDER T., SANDSTRÖM E. 2008. The creosote content of used railway crossties as compared with European stipulations for hazardous waste. *Science of the Total Environment* 402: 106–112.
183. TOFTS R.J. 2004. *Geranium robertianum* L. *Journal of Ecology* 92: 537–555.
184. TORSTENSSON L., BÖRJESSON E., STENSTRÖM J. 2005. Efficacy and fate of glyphosate on Swedish railway embankments. *Pest management science* 61: 881–886.
185. TORSTENSSON L. 2001. Use of herbicides on railway tracks in Sweden. *Pesticide Outlook* 12:16–21.
186. TUFFI SANTOS L.D., SANT'ANNA-SANTOS B.F., MEIRA R.M.S.A., FERREIRA F.A., TIBURCIO R.A.S., MACHADO A.F.L. 2009. Leaf anatomy and morphometry in three eucalypt clones treated with glyphosate. *Brazilian Journal of Biology* 69(1): 129–136.
187. TUSH D., LOFTIN K.A., MEYER M.T. 2013. Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1319: 80–87.
188. VANDELOOK F., VAN ASSCHE J.A. 2010. A combined physical and physiological dormancy controls seasonal seedling emergence of *Geranium robertianum*. *Plant Biology* 12: 765–771.
189. VAN BRUGGEN A.H.C., HE M.M., SHIN K., MAI V., JEONG K.C., FINCKH M.R., MORRIS J.G. 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of The Total Environment* 616: 255–268.
190. VAUGHN K.C., DUKE S.O. 1986. Ultrastructural effects of glyphosate on *Glycine max* seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 26(1): 56–65.
191. VEKEMANS X. 2002. AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
192. VEKEMANS X., T. BEAUWENS, M. LEMAIRE AND I. ROLDAN-RUIZ 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11: 139–151.
193. VOS P., HOGERS R., BLEEKER M., MARTIN REIJANS, VAN DE LEE T., HORNES M., FRIJTERS A., POT J., PELEMAN J., KUIPER M. AND ZABEAU M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407–4414.
194. WALKER C.H., HOPKIN S.P., SIBLY R.M., PEAKALL D.B. 2002. Podstawy ekotoksykologii. PWN, Warszawa.
195. WANG C.J., LIU Z.Q. 2007. Foliar uptake of pesticides – Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 1–8.

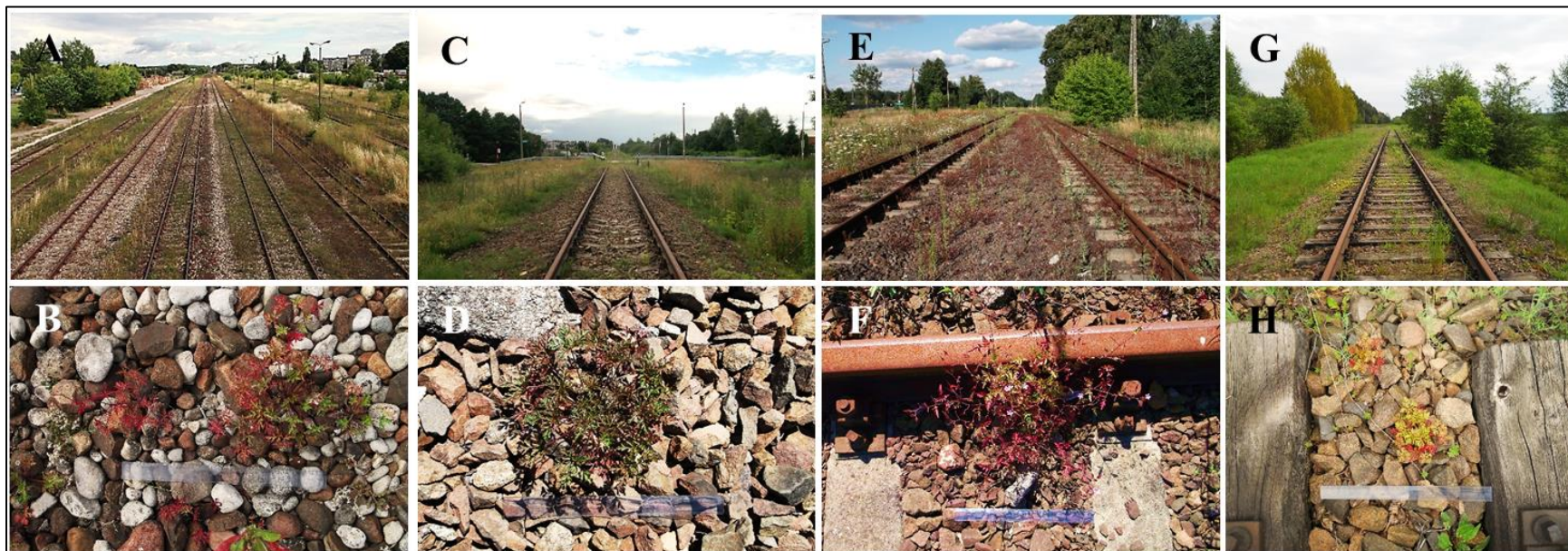
196. WANG C.T., HUANG Z.J., HE C.F., BI C.L., SHEN Y.Z. 2001. Detection of the wheat salt-tolerant-mutant using PCR-SSCP combining with direct sequencing. *Yi Chuan, Xue Bao* 28: 852–855.
197. WANG Y.M., LIN X.Y., DONG B., WANG Y.D., LIU B. 2004. DNA methylation polymorphism in a set of elite rice cultivars and its possible contribution to inter-cultivar differential gene expression. *Cellular and Molecular Biology Letters* 9: 543–556.
198. WARWICK S.I. 1991. Herbicide resistance in weedy plants: physiology and population biology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 22(1): 95–114.
199. WASSOM J.J., TRANEL P.J. 2005. Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species. *Journal of Heredity* 96(4): 410–416.
200. WĄSOWICZ P., PIELICHOWSKA M., PRZEDPEŁSKA-WĄSOWICZ E. M., PIOTR BEDNAREK P., SZAREK-ŁUKASZEWSKA G., ABRATOWSKA A., WIERZBICKA M. 2014. Physiological and genetic differentiation between metallicolous and non-metallicolous diploid populations of Alpine *Biscutella laevigata* (Brassicaceae) in the Tatra Mountains and the Northern Carpathian Foreland. *Annales Botanici Fennici* 51: 227–239.
201. WEBER M. 1996. Apertural chambers in *Geranium*: development and ultrastructure. *Sexual Plant Reproduction* 9:102–106.
202. WELSH J., MCCLELLAND M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic acids research* 18(24): 7213–7218.
203. WIERZBICKA M. 1999. Comparison of lead tolerance in *Allium cepa* with other plant species. *Environmental Pollution* 104(1): 41–52.
204. WIERZBICKA M. 2015. Obrona roślin przed metalami ciężkimi. W: WIERZBICKA M. (Red.) *Ekotoksykologia. Rośliny, gleby, metale*. Wydawnictwo Uniwersytetu Warszawskiego, Warszawa: 83–95.
205. WIERZBICKA M., BEMOWSKA-KALABUN O., GWOREK B. 2015. Multidimensional evaluation of soil pollution from railway tracks. *Ecotoxicology* 24: 805–822.
206. WIERZBICKA M., GALERA H., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., WILKOMIRSKI B. 2014. *Geranium robertianum* L., plant form adapted to the specific conditions along railway: “railway-wandering plant”. *Plant Systematics and Evolution* 300(5): 973–985.
207. WIERZBICKA M., ROSTAŃSKI A. 2002. Microevolutionary changes in ecotypes of calamine waste heap vegetation near Olkusz, Poland: a review. *Acta Biologia Cracoviensia Series Botanica* 44: 7–19.
208. WIERZBICKI A.T. 2004. Dziedziczenie epigenetyczne. *Kosmos* 3(53): 271–280.
209. WILLIAMS G.M., KROES R., MUNRO I.C. 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31(2): 117–165.
210. WILLIAMS J.G., KUBELIK A.R., LIVAK K.J., RAFALSKI J.A., TINGEY S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research* 18(22): 6531–6535.
211. WILKOMIRSKI B., GALERA H., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., STASZEWSKI T., MALAWSKA M. 2012. Railway tracks – habitat conditions, contamination, floristic settlement – a review. *Environment and Natural Resources Research* 2(1): 86.
212. WILKOMIRSKI B., SUDNIK-WÓJCIKOWSKA B., GALERA H., WIERZBICKA M., MALAWSKA M. 2011. Railway transportation as a serious source of organic and inorganic pollution. *Water Air and Soil Pollution* 218: 333–345.
213. WINFOLIA 2007. WinFOLIA 2007b for leaf analysis. Reagent Instruments Inc.
214. WOLFE A.D., LISTON A. 1998. Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. W: SOLTIS D.E., SOLTIS P.S., DOYLE J.J. (Red.). *Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishers, London: 43–86.
215. WÓJCIK M., DRESLER S., JAWOR E., KOWALCZYK K., TUKIENDORF A. 2013. Morphological, physiological and genetic variation between metallicolous and nonmetallicolous populations of *Dianthus carthusianorum*. *Chemosphere* 90(3): 1249–1257.
216. WRIGHT S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16(2): 97–159.
217. WRIGHT S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323–354.
218. WRIGHT S. 1978. Volume 4: Variability within and among natural populations. *Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes*: University of Chicago Press.
219. WRÓBEL B., ZIENKIEWICZ K., SMOLIŃSKI D.J., NIEDOJADŁO J., ŚWIDZIŃSKI M. 2005. Podstawy mikroskopii elektronowej. Skrypt dla studentów. Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń.
220. WRÓBEL S. 2007. Reakcja roślin ziemniaka na glifosat zastosowany do desykacji naci. *Progress in Plant Protection* 47(3): 316–320.

221. YEO P.F. 1985. Hardy Geraniums. Croom-Helm, London, UK.
222. YU Y., ZHU H., FRANTZ J.M., REDING M.E., CHAN K.C., OZKAN, H.E. 2009. Evaporation and coverage area of pesticide droplets on hairy and waxy leaves. *Biosystems engineering* 104(3): 324–334.
223. YUAN C.I., CHANG M.Y., CHEN Y.M. 2002. Triple mechanisms of glyphosate-resistance in a naturally occurring glyphosate-resistant plant *Dicliptera chinensis*. *Plant Science* 163: 543–554.
224. ZHANG H., WANG Z., ZHANG Y., HU Z. 2012. The effects of the Qinghai–Tibet railway on heavy metals enrichment in soils. *Science of the Total Environment* 439: 240–248.
225. ZYCH M., STPICZYŃSKA M., ROGUZ K. 2013. Reproductive biology of the Red List species *Polemonium caeruleum* (Polemoniaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 173(1): 92–107.

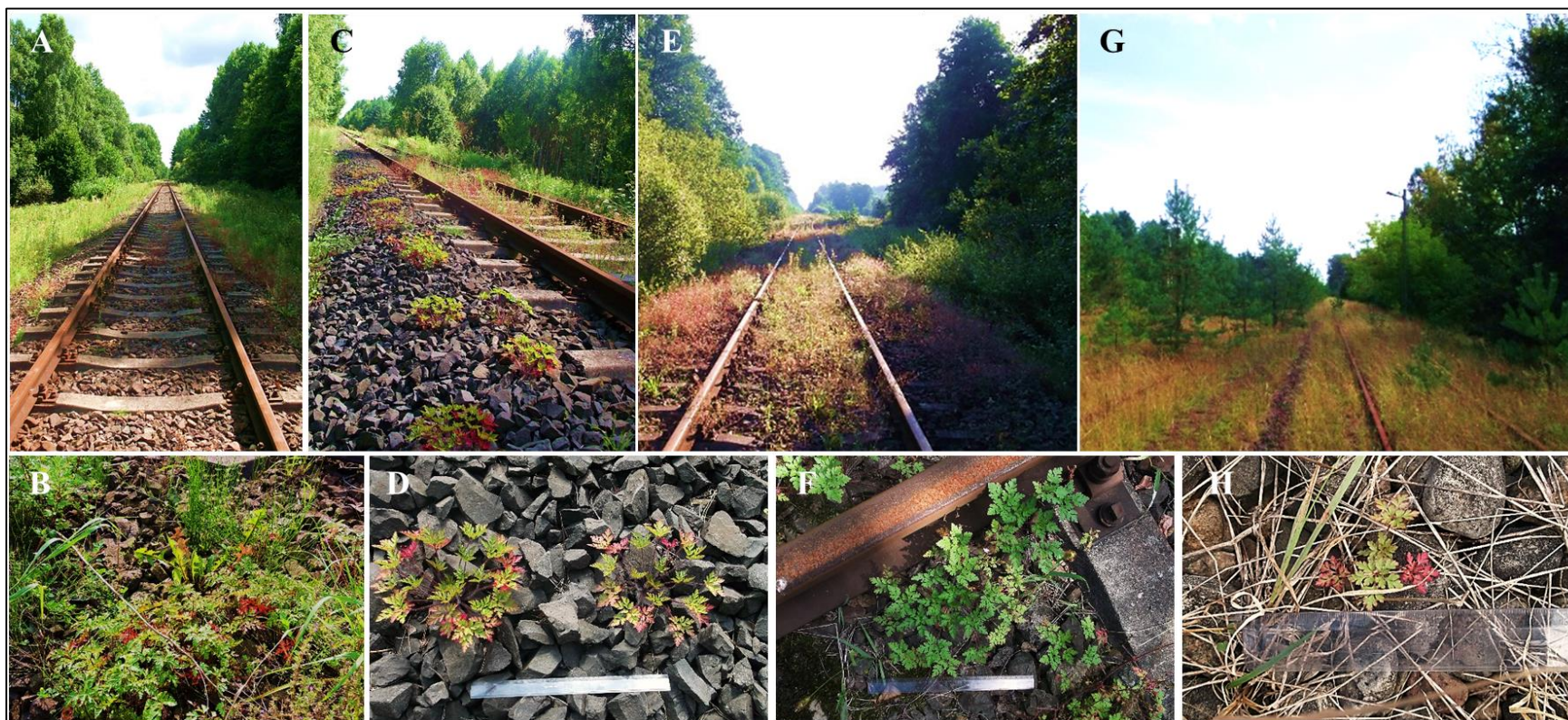
DOKUMENTY ON LINE:

1. BACH R. 2018. Kolejowa strona przepisowa. W: www.kolej.krb.com.pl/ [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2005 [Pozyskano: 20.06.2018]. Dostępny w: <http://www.kolej.krb.com.pl/>
2. BANACH M. 2016A. Pat w sprawie pociągu z Białegostoku do Puszczy Knyszyńskiej. Będzie krótsza trasa? W: bialystok.onet.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2017 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: <http://bialystok.onet.pl/bialystok-rusza-pociag-do-puszczy-knyszynskiej/0rrkph>
3. BANACH M. 2016B. Pociąg z Białegostoku do Puszczy Knyszyńskiej znowu kursuje. W: bialystok.onet.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2017 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: <http://bialystok.onet.pl/pat-w-sprawie-pociagu-z-bialegostoku-do-puszczy-knyszynskiej-bedzie-krotsza-trasa/z6lc6h>
4. ESRI 2016. ArcGIS Desktop 10.5. Environmental Systems Research Institute, Inc. W: desktop.arcgis.com [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2016 [Pozyskano: 23.01.2017]. Dostępny w: <http://desktop.arcgis.com/en/arcmap/latest/get-started/setup/arcgis-desktop-system-requirements.htm>
5. HEAP I. 2016. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. W: www.weedscience.org [on line]. Ostatnia aktualizacja: 13.12.2016 [Pozyskano: 13.12.2016]. Dostępny w: <http://www.weedscience.org/>
6. MACHERY-NAGEL 2014. Genomic DNA from plant. User manual. NucleoSpin® Plant II. W: www.mn-net.com [on line]. Ostatnia aktualizacja: 07.2014 [Pozyskano: 16.01.2017]. Dostępny w: http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic%20DNA/UM_gDNAPlant_NSPlantII.pdf
7. PKP POLSKIE LINIE KOLEJOWE S.A. 2016. Mapa interaktywna linii kolejowych. Wersja: 1.4.10. W: PKP Polskie Linie Kolejowe S.A. [on line]. Ostatnia aktualizacja: 26.10.2016 [Pozyskano: 23.02.2017]. Dostępny w: <http://mapa.plk-sa.pl/>
8. PUBCHEM: 3496. Compound Summary for CID 3496. National Center for Biotechnology Information. W: PubChem Open Chemistry Database [on line]. [Pozyskano: 19.12.2016] Dostępny w: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3496#section=Top>
9. RYNEK KOLEJOWY 2017. Podlaskie: Udany powrót pociągów pasażerskich do Walił. W: www.rynek-kolejowy.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2017 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: <http://www.rynek-kolejowy.pl/mobile/podlaskie-udany-powrot-pociagow-pasazerskich-do-walil-80312.html>
10. WIERZBICKI S. 2013. Kolej Białystok – Wołkowysk (Zubki Białostockie). W: www.radunin.hostit.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2013 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: http://www.radunin.hostit.pl/okolice.php?podstrona=okolice_kolej
11. WILD FLOWERS OF NEW YORK 1918. Wild Flowers of New York Part 1, University of the State of New York, State Museum, Albany. W: [commons.wikimedia.org](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Geranium_robertianum_WFNY-119.jpg) [on line]. Ostatnia aktualizacja 29.11.2016 [Pozyskano 12.01.2017]. Dostępny w: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Geranium_robertianum_WFNY-119.jpg
12. WROTA PODLASIA 2016A. Po szesnastu latach wraca połączenie kolejowe Białystok – Waliły. W: www.wrotapodlasia.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2017 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: https://www.wrotapodlasia.pl/pl/region_i_gospodarka/po-szesnastu-latach-wraca-polaczenie-kolejowe-bialystok-walily.html
13. WROTA PODLASIA 2016B. To już ostatni w tym sezonie weekend z pociągiem Białystok – Waliły. W: www.wrotapodlasia.pl [on line]. Ostatnia aktualizacja: 2017 [Pozyskano: 06.03.2017]. Dostępny w: https://www.wrotapodlasia.pl/pl/region_i_gospodarka/to-juz-ostatni-w-tym-sezonie-weekend-z-pociagiem-bialystok--walily.html

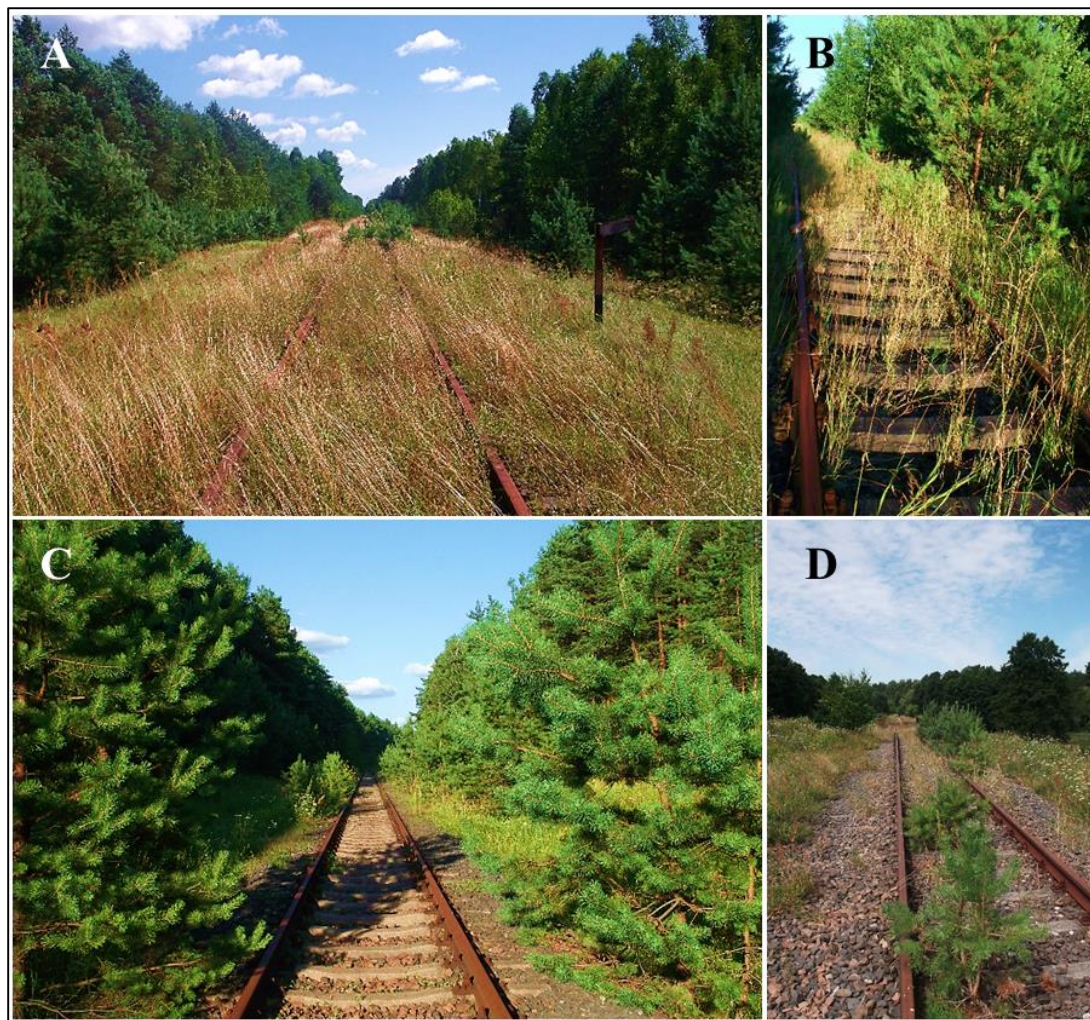
VIII. TABLICE



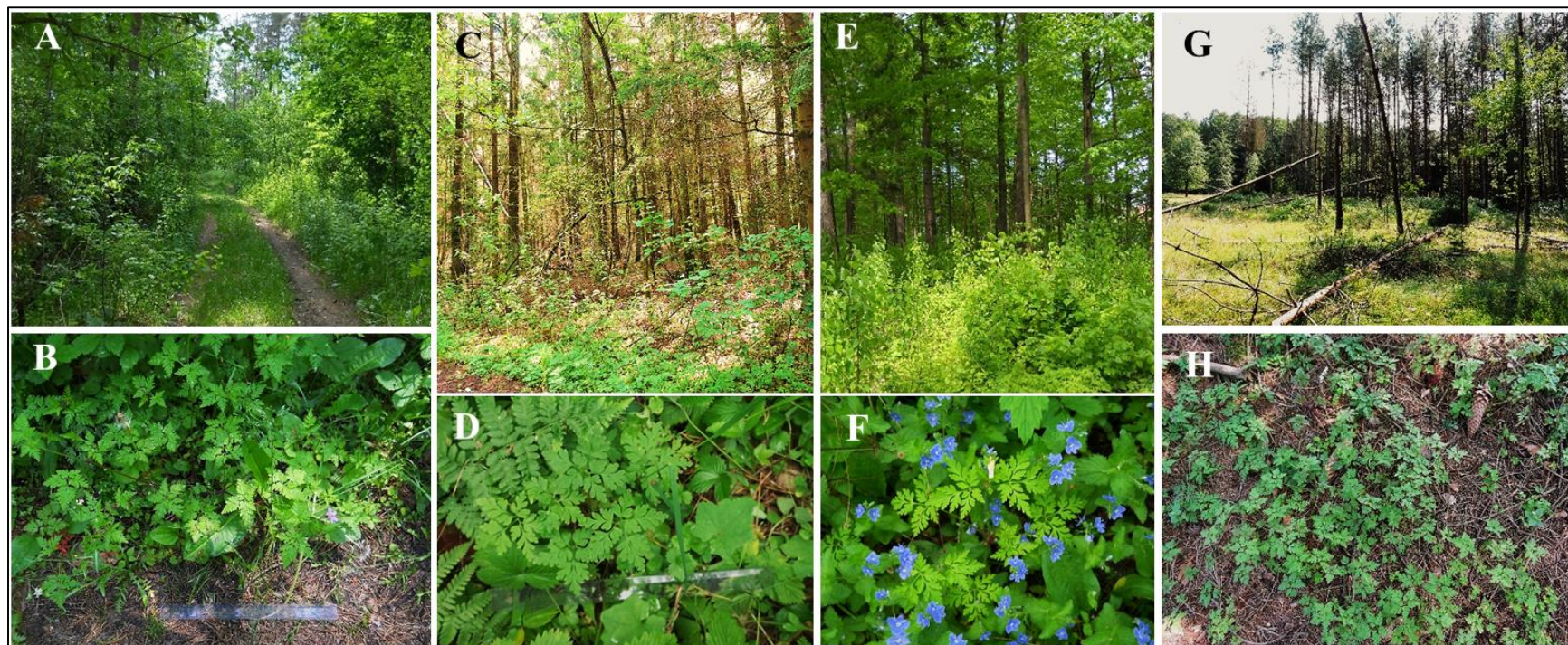
TABLICA I. Słoneczne stanowiska na torach kolejowych, gdzie wystąpiły rośliny *G. robertianum*. Północno-wschodnia Polska, linia kolejowa nr 37. Początkowy odcinek linii nr 37: stacja Białystok Fabryczny – BF (A, B), B1 (C, D). Środkowy odcinek linii, miejscowość, stanowisko na wysokości stacji Waliły – Wal3 (E, F). Ostatni punkt badanej linii, na zachód od miejscowości Waliły-Stacja, za stacją Zubki Białostockie: ZB-P1 (O, P).



TABLICA II. Częściowo zacienione stanowiska na torach kolejowych, gdzie wystąpiły rośliny *G. robertianum*. Północno-wschodnia Polska, linia kolejowa nr 37. Stanowisko ze środkowego odcinka linii nr 37, na zachód od miejscowości Waliły-Stacja: L-Zaj (A, B), W-SB7A (C, D), W-SB6C (E, F). Stanowisko z końcowego odcinka tej linii na zachód od miejscowości Waliły-Stacja: stacja kolejowa Zubki-Białostockie – ZB (G, H).



TABLICA III. Stanowiska na torach kolejowych, gdzie nie wystąpiły rośliny *G. robertianum*. Północno-wschodnia Polska, linia kolejowa nr 37. Stanowiska ze środkowego odcinka linii kolejowej, na wschód od miejscowości Walif-Stacja: tory otoczone borem (A, B, C), tory porośnięte roślinnością trawiastą (A, B), tory, na które zaczęły wkraczać drzewa iglaste (D).



TABLICA IV. Leśne stanowiska, w których wystąpiły rośliny *G. robertianum*. Północno-wschodnia Polska, okolice linii kolejowej nr 37. Okolice początku linii nr 37, lasy pod Białymstokiem: Sob-Las1 (A, B). Stanowiska z okolic środkowego odcinka linii nr 37, na zachód od miejscowości Waliły-Stacja: las za wsią Zajezerce – Zaj-Las (C, D), las w pobliżu stacji Sokole Białostockie – Sok-Las1 (E, F). Okolice środka linii nr 37: las za miejscowością Waliły-Stacja – Wal-Las (G, H).



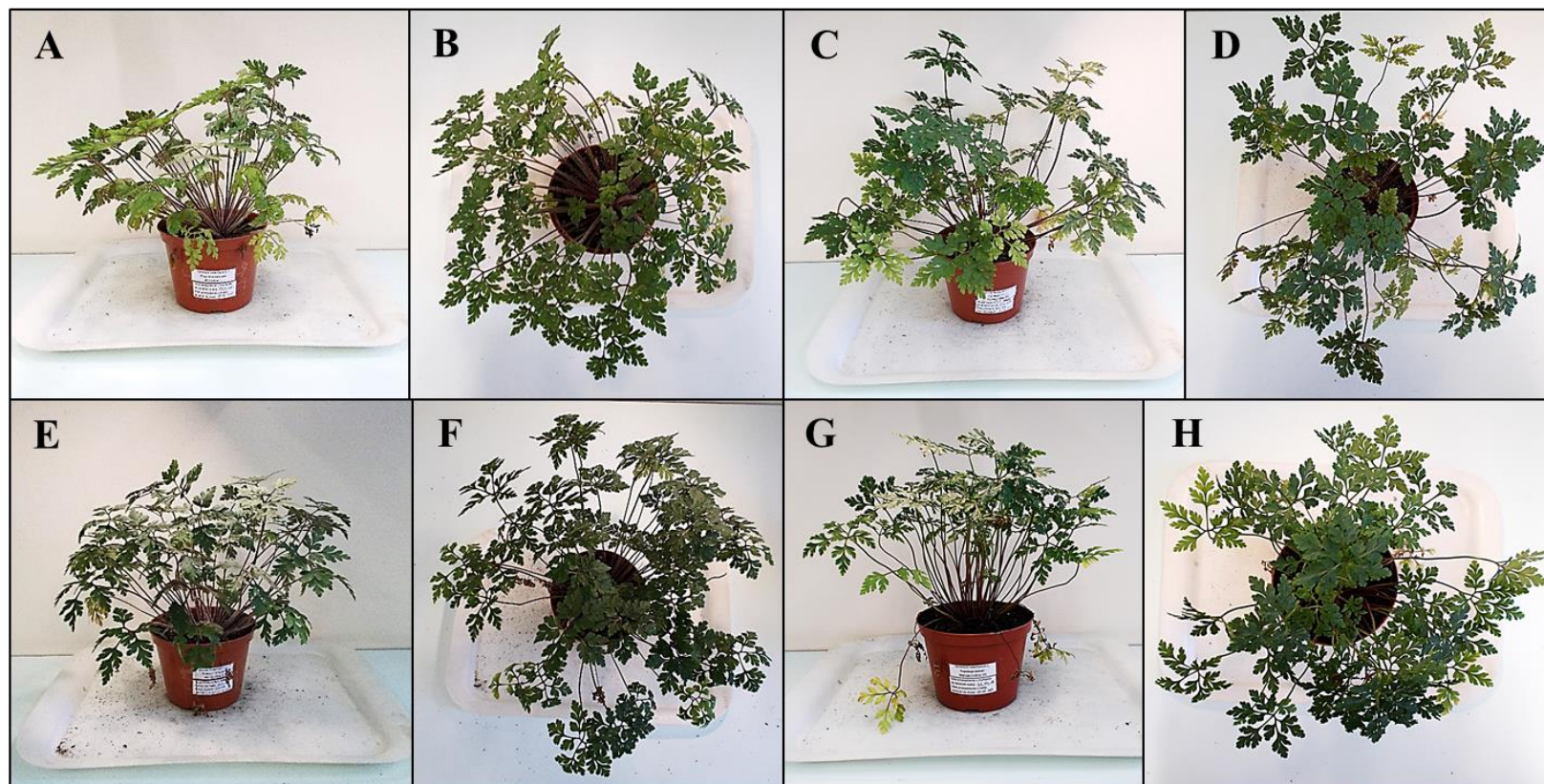
TABLICA V. Leśne stanowiska, na których wystąpiły rośliny *G. robertianum*. Północno-wschodnia Polska, okolice linii kolejowej nr 37. Okolice środka linii nr 37: las w pobliżu miejscowości Gródek – Gr-Las-2 (A, B); las na północ od miejscowości Waliły-Stacja, przy rzece Grzybówce (C, D). Stanowisko z okolic końcowego odcinka linii nr 37, na zachód od miejscowości Waliły-Stacja, w pobliżu stacji Zubki Białostockie – ZB-Las1 (E, F). Punkt odniesienia w Kampinoskim Parku Narodowym, w pobliżu obszaru ochrony ścisłej „Sieraków” – KPN1 (G, H).



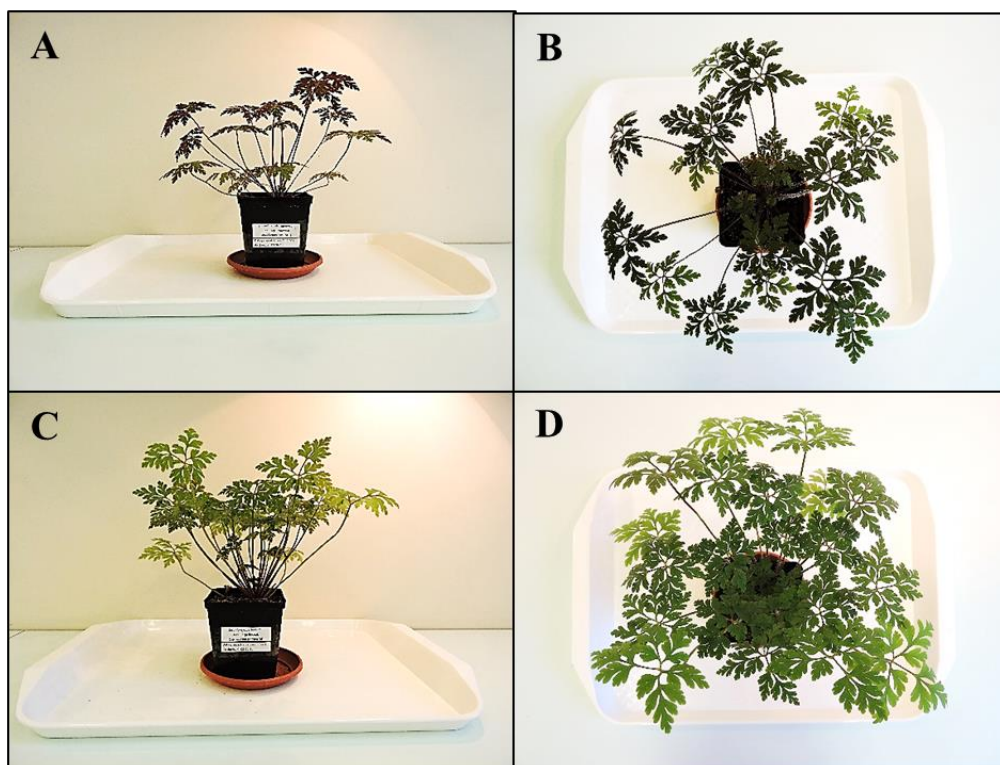
TABLICA VI. Pokrój roślin *G. robertianum* z populacji torowej z Walił-Stacji.



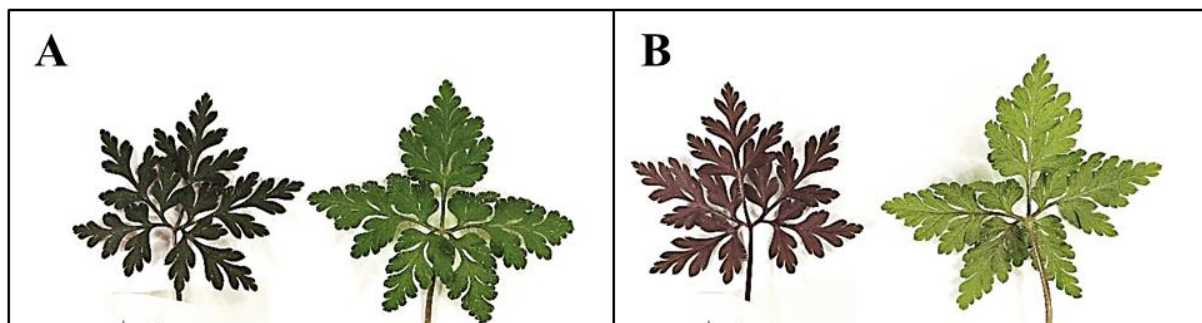
TABLICA VII. Pokrój rośliny *G. robertianum* z populacji leśnej spod Białegostoku.



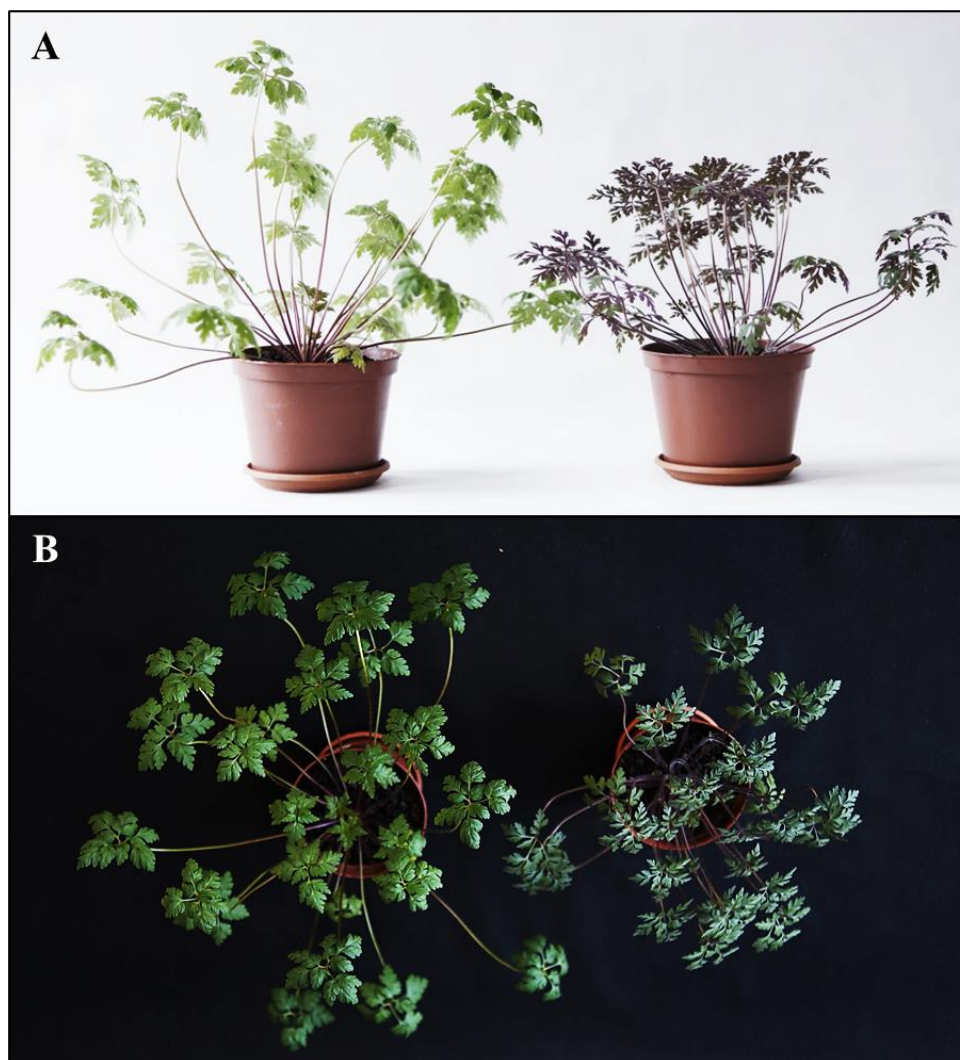
TABLICA VIII. Pokrój roślin *G. robertianum* z populacji torowych (od lewej): BF (2013) (A, B), Wał3 (2013) (E, F), oraz roślin z populacji leśnych (od prawej): Zaj-Las (2013) (C, D), Wał-Las (2013) (G, H). Wiek roślin 6 miesięcy, hodowla szklarniowa.



TABLICA IX. Pokrój roślin *G. robertianum* torowej Wal-St (2008) (A, B) oraz z populacji leśnej Zaj-Las (2008) (C, D), w wieku około 3 miesięcy, hodowanych w szklarni.



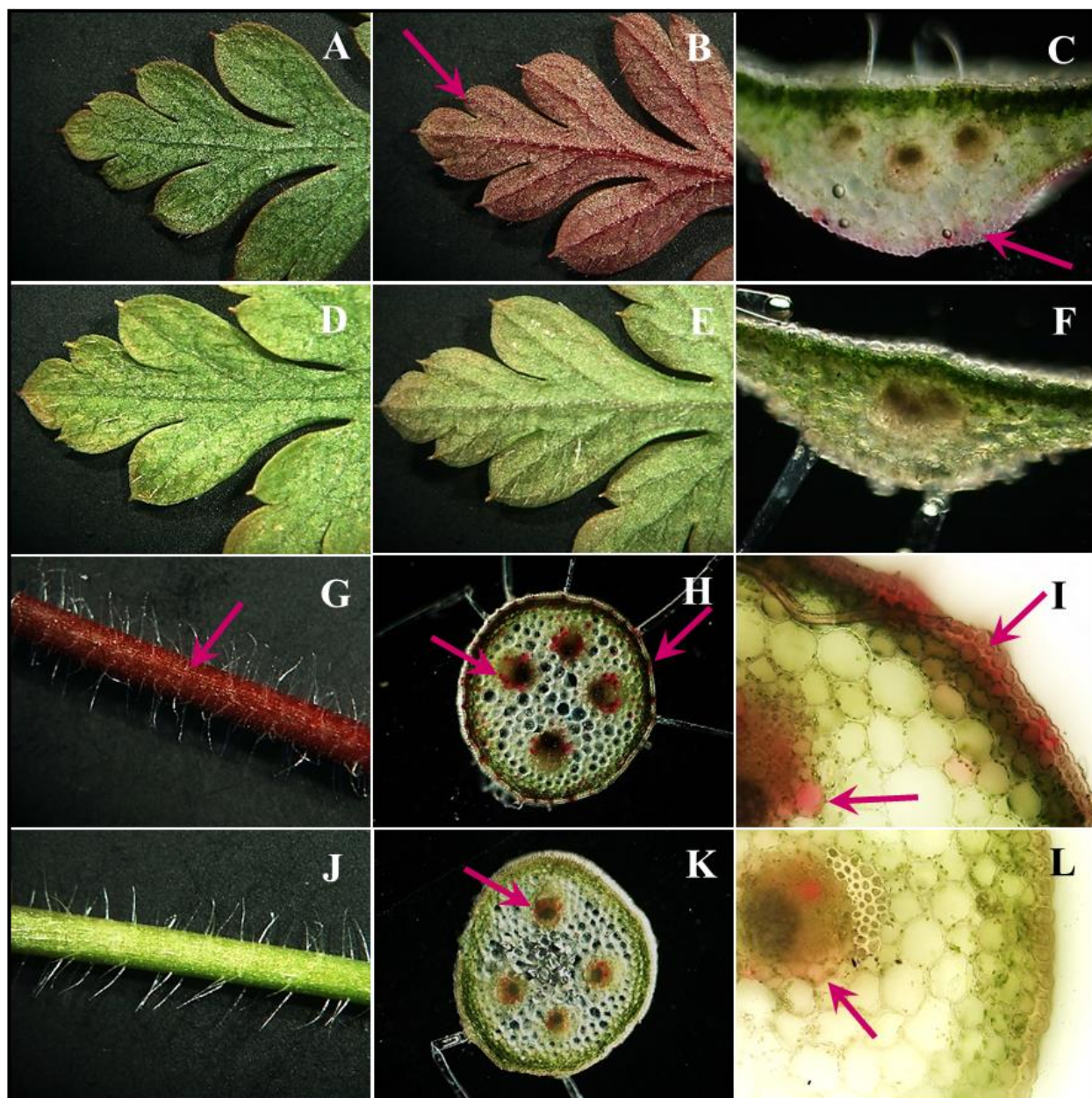
TABLICA X. Wygląd dojrzałych liści roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) (z lewej) oraz leśnej Zaj-Las (2008) (z prawej), w wieku około 6 miesięcy, hodowanych w szklarni. Brzuszna strona blaszek liściowych (A) i grzbietowa strona blaszek liściowych (B).



TABLICA XI. Pokrój roślin *G. robertianum* z populacji leśnej Zaj-Las (2014) (z lewej) oraz torowej Wal-St (2008) (z prawej) w wieku około 5 miesięcy, hodowanych w szklarni.



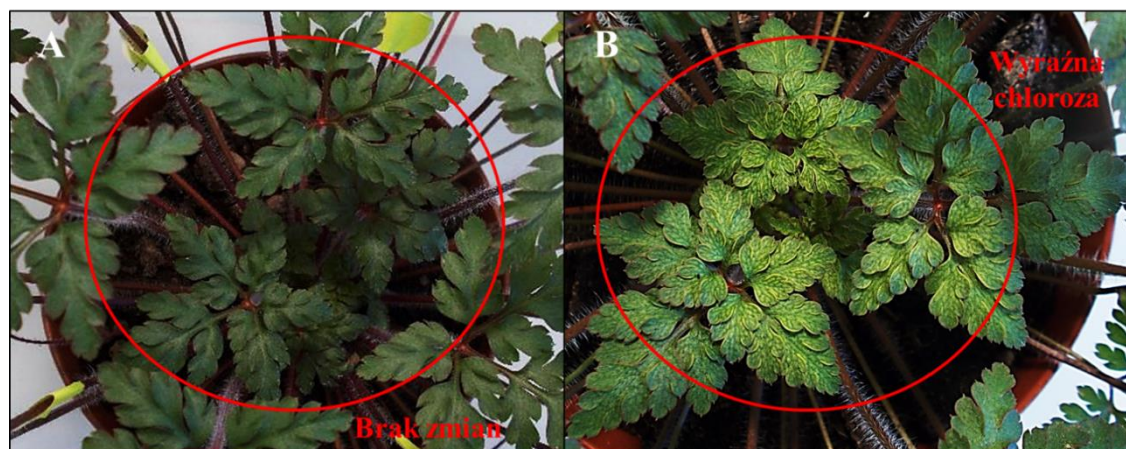
TABLICA XII. Wygląd grzbietowej strony blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) (z prawej) oraz leśnej Zaj-Las (2014) (z lewej) w wieku około 5 miesięcy, hodowanych w szklarni.



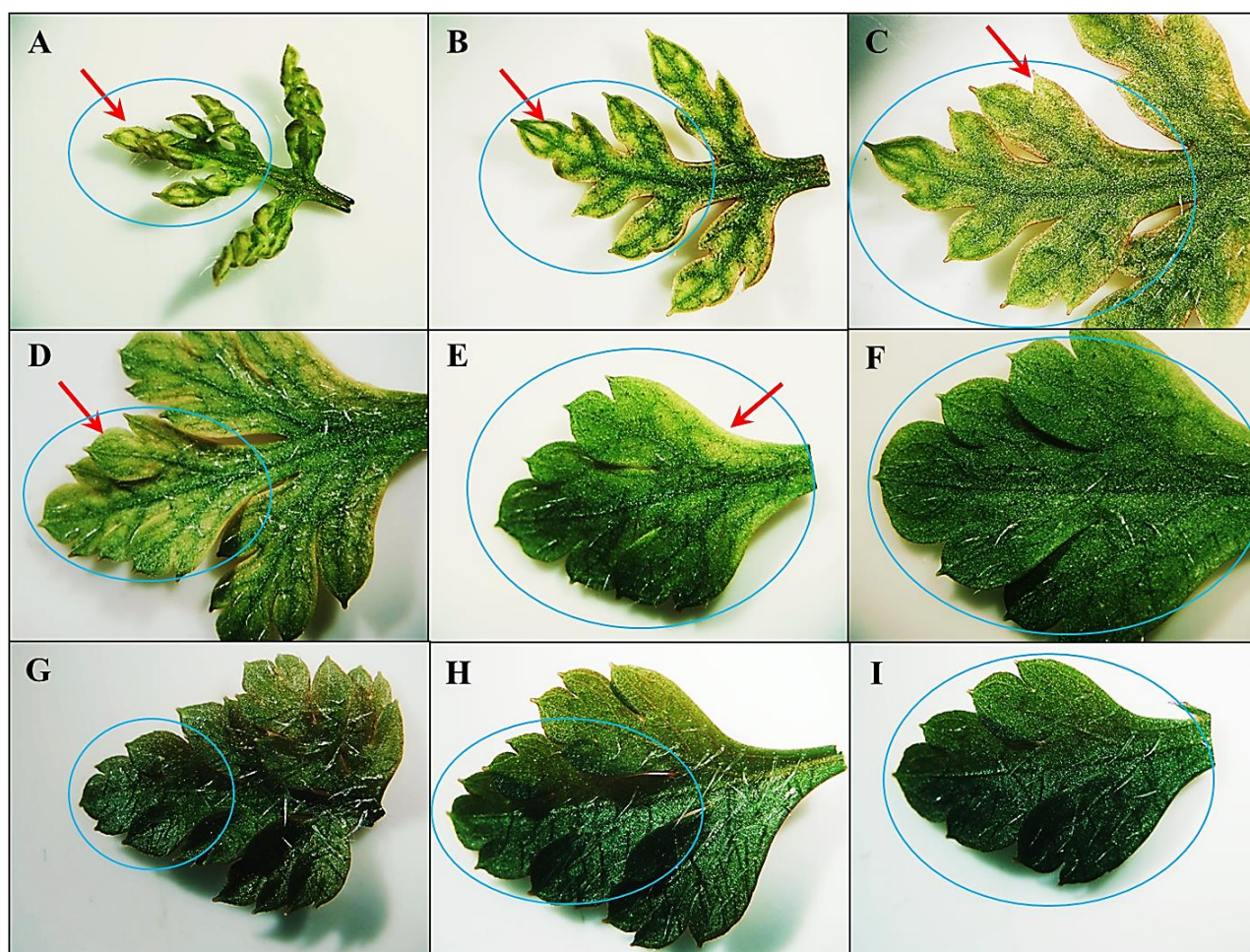
TABLICA XIII. Wygląd liści populacji torowej Wal-St (2008) (A-C, G-I) i leśnej Zaj-Las (2014) (D-F, J-L), wybrane zdjęcia spod binokularu i mikroskopu świetlnego. Binokular (pow. 1x): brzuszna strona blaszek liściowych (A, D), grzbietowa strona blaszek liściowych (B, E), ogonki liściowe (G, J). Mikroskop (pow. 4x, 20x): przekroje przez blaszki liściowe (C, F), przekroje przez ogonki liściowe (H, I, K, L). Różowymi strzałkami (→) przedstawiono miejsca wystąpienia antocyjanów w liściach.



TABLICA XIV. Wygląd roślin *G. robertianum* z populacji Zaj-Las (2014) (roślina z lewej), Wał3 (2014) (roślina na środku) i Wał-St (2008) (roślina z prawej) po 26 dniach suszy. Widok z przodu (A) i od góry (B).

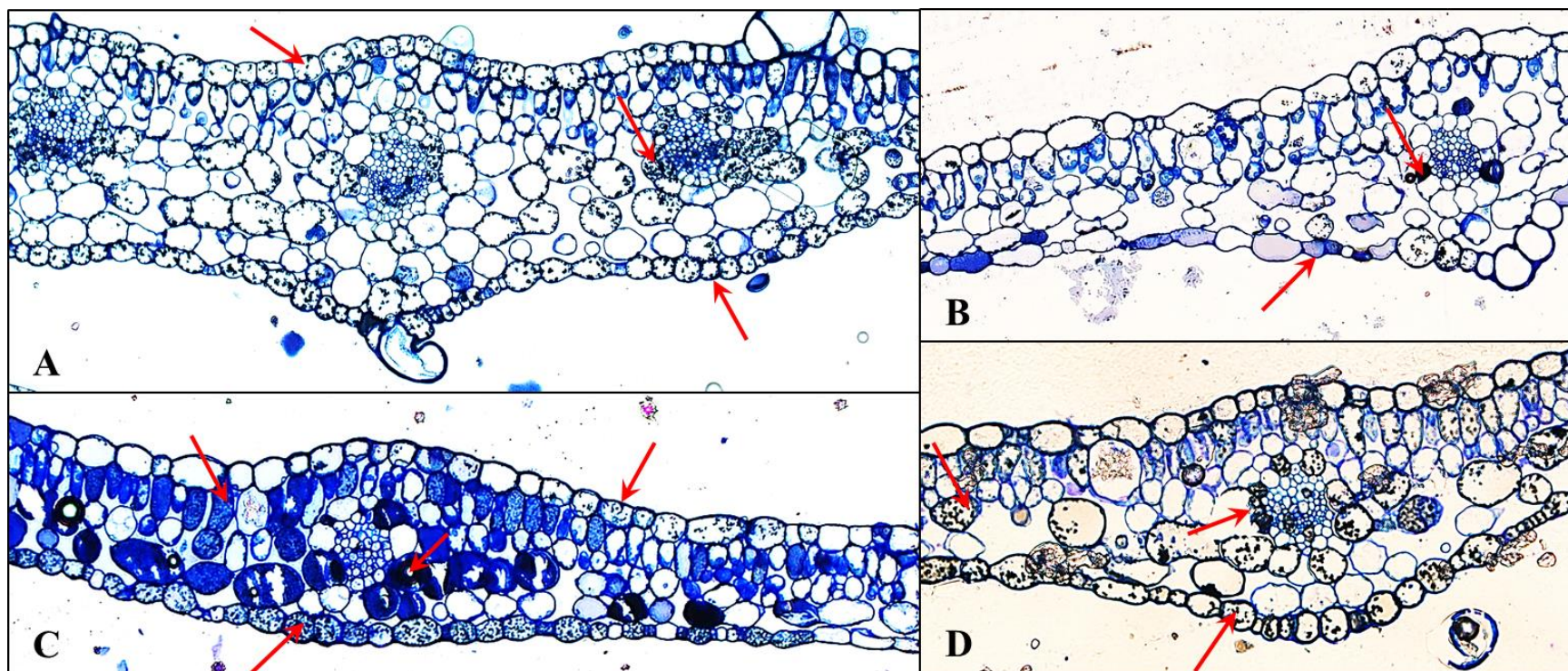


TABLICA XV. Rośliny *G. robertianum* z populacji torowej W-SB6 (wiek około 3 miesięcy): z kontroli (A), oraz dwa tygodnie po oprysku herbicydem Roundup w dawce 60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu na roślinę (2400 µg glifosatu) (B). Czerwonymi okręgami zaznaczono najmłodsze liście na roślinach.



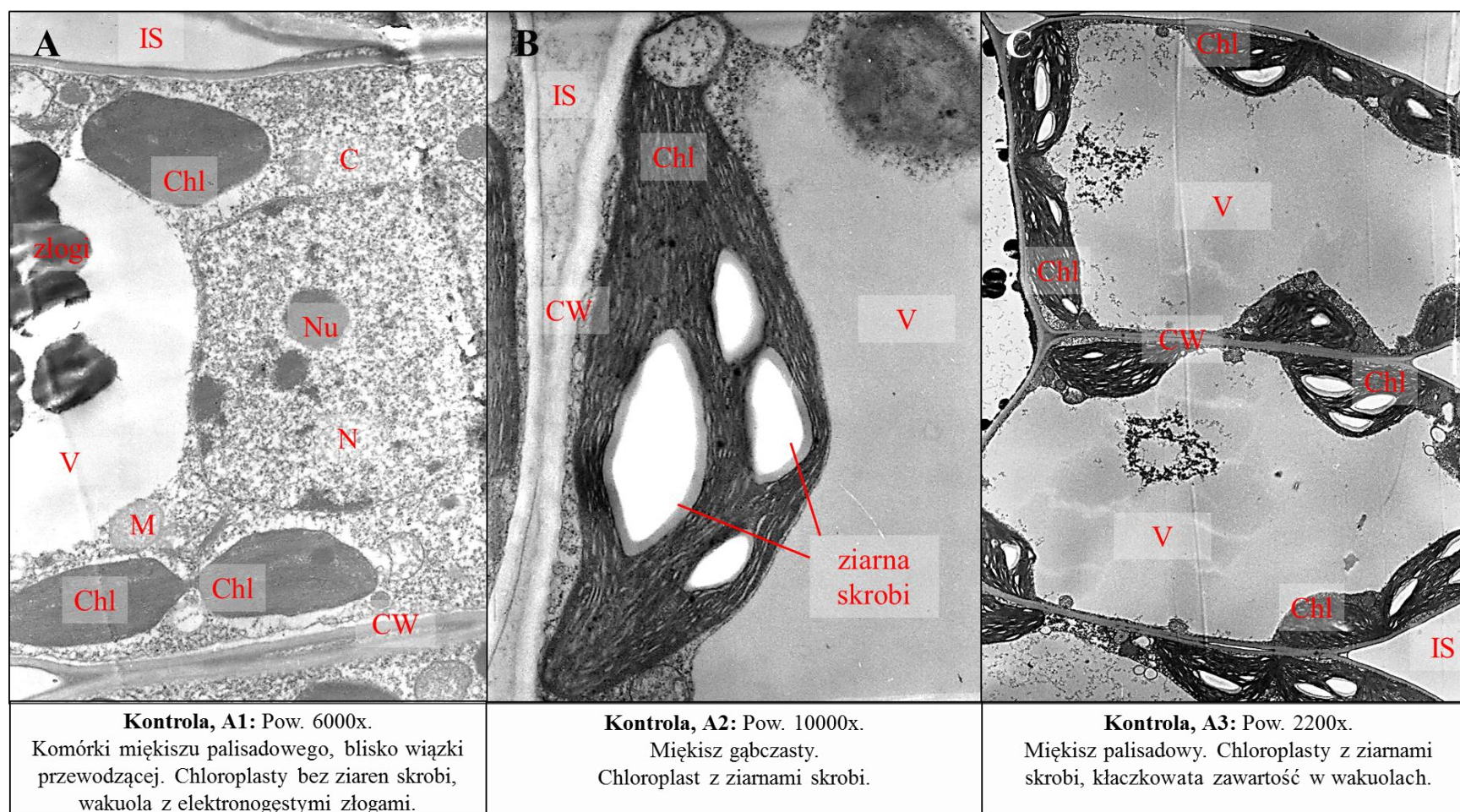
TABLICA XVI. Reakcja roślin *G. robertianum* na herbicydu Roundup – wygląd liści roślin z populacji torowych. Czerwonymi strzałkami oznaczono liście z chlorozami. Niebieskimi okręgami oznaczono fragmenty liści obserwowane na kolejnych zdjęciach z danego wariantu. Binokular, pow. 1x:

- **40 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant B:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 1 dzień (A); 22 dni od oprysku, wiek liścia 9 dni (B); 28 dni od oprysku, wiek liścia 15 dni (C); wraz z czasem widoczna jest stopniowa regeneracja liści na roślinach *G. robertianum*.
- **40 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant F:** 16 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 10 dni (D); 19 dni od oprysku, wiek liścia 13 dni (E); 21 dni od oprysku, wiek liścia 15 dni (F); wraz z czasem widoczna jest stopniowa regeneracja liści na roślinach *G. robertianum*.
- **Kontrola, warianty A1, A2, A3:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 1 dzień (G); 14 dni od startu, wiek liścia 8 dni (H); 14 dni od startu, wiek liścia 15 dni (I).



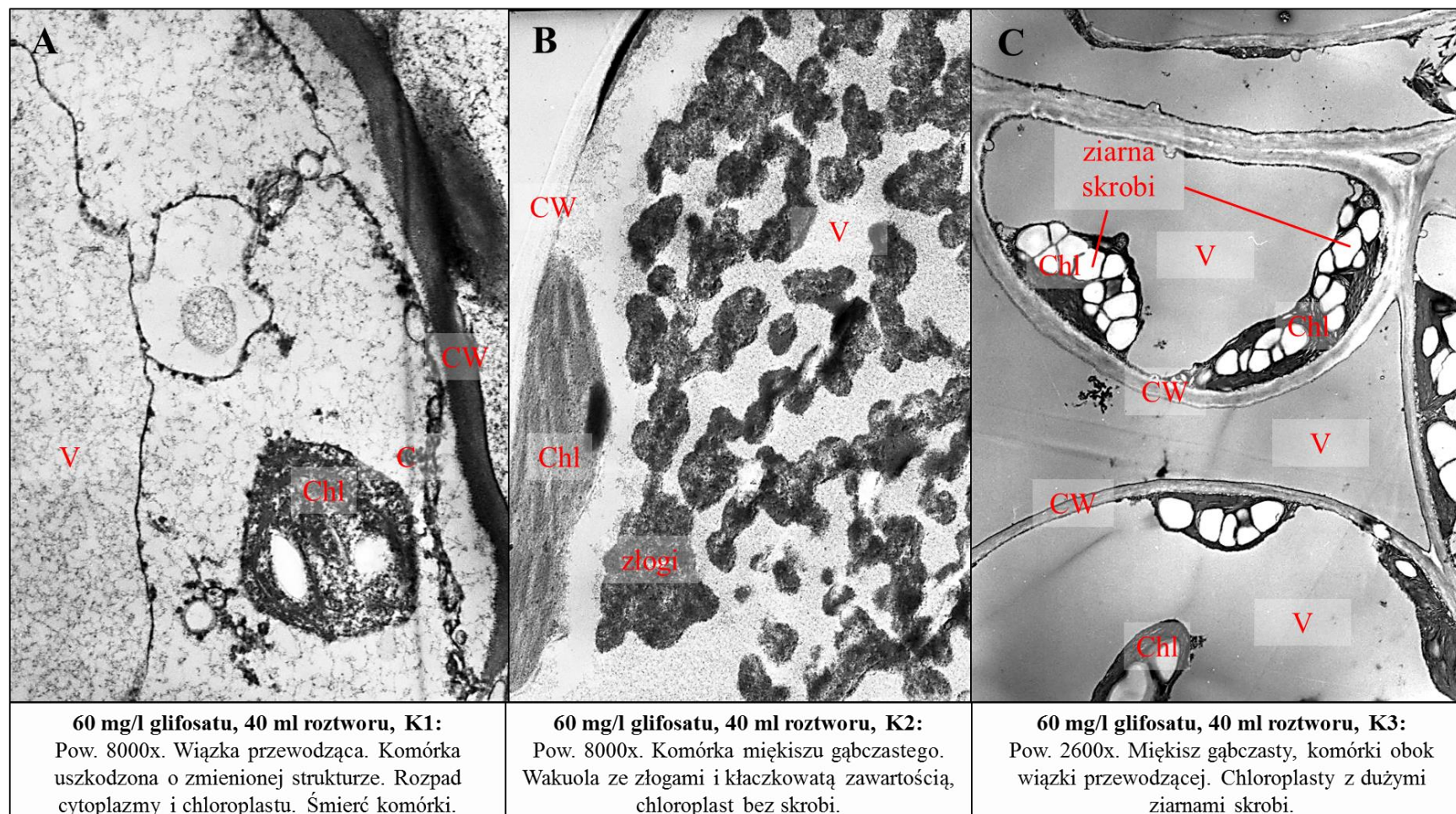
TABLICA XVII. Reakcja roślin *G. robertianum* na herbicydu Roundup. Przekroje przez blaszki liściowe roślin *G. robertianum* z populacji torowych, z kontroli (A, B) i wariantów po oprysku herbicydem (C, D). Strzałkami oznaczono nagromadzenia w komórkach ciemnych złogów i charakterystycznych „szarości”. Mikroskop świetlny, pow.: 10x:

- **Kontrola, wariant A2:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 8 dni (A).
- **Kontrola, wariant A3:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 15 dni (B).
- **60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant K2:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 8 dni (C).
- **60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant K3:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 15 dni (D).



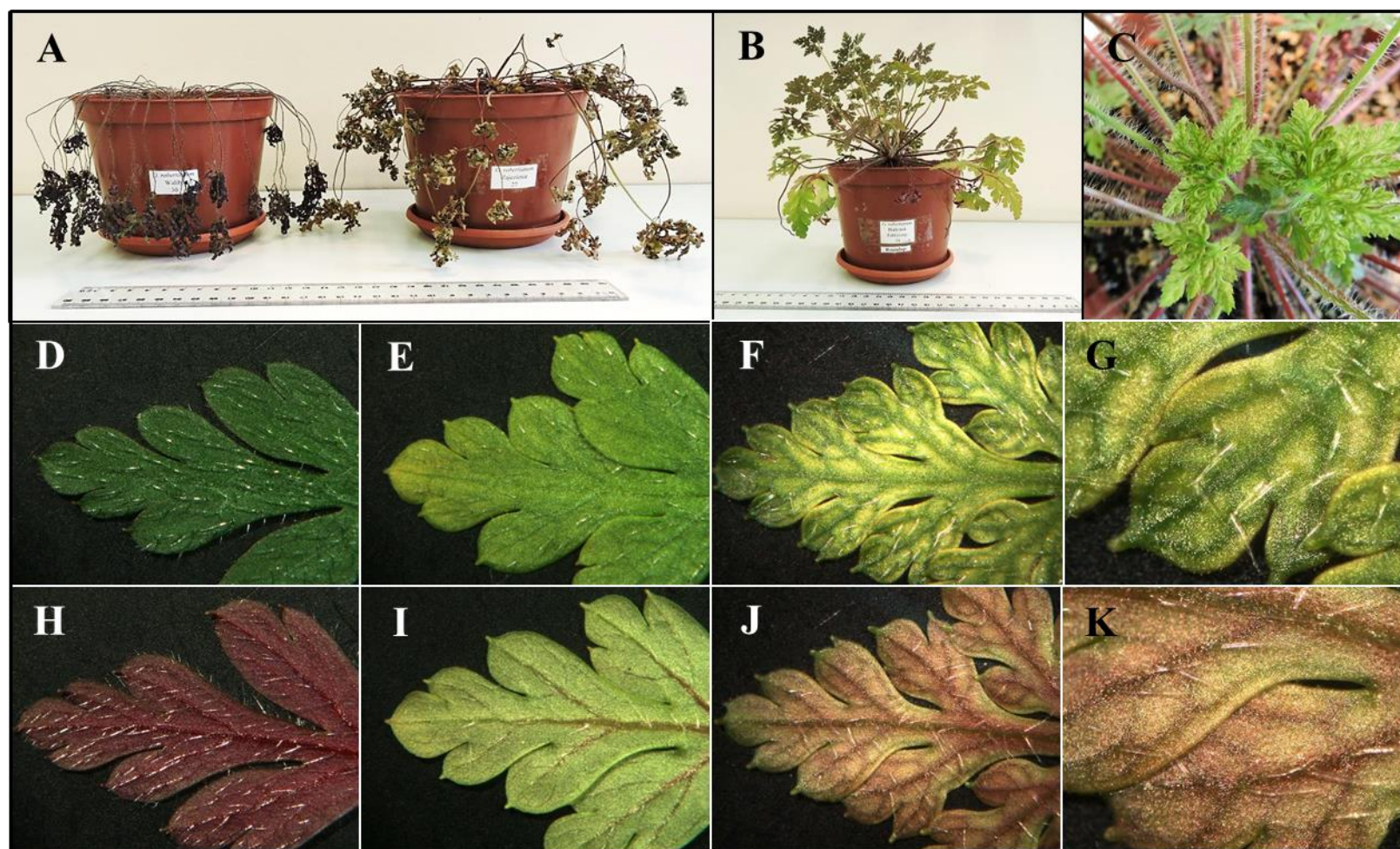
TABLICA XVIII. Reakcja roślin *G. robertianum* na herbicydu Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji torowych, w kontroli. **Oznaczenia na elektronogramach:** N – jądro; Nu – jąderko; CW – ściana komórkowa; IS – przestrzeń międzykomórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; M – mitochondrium; Chl – chloroplast; ziarna skrobi; złogi elektronogęste.

- **Kontrola, wariant A1:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 1 dzień (A).
- **Kontrola, wariant A2:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 8 dni (B).
- **Kontrola, wariant A3:** 14 dni od startu obserwacji, wiek liścia 15 dni (C).

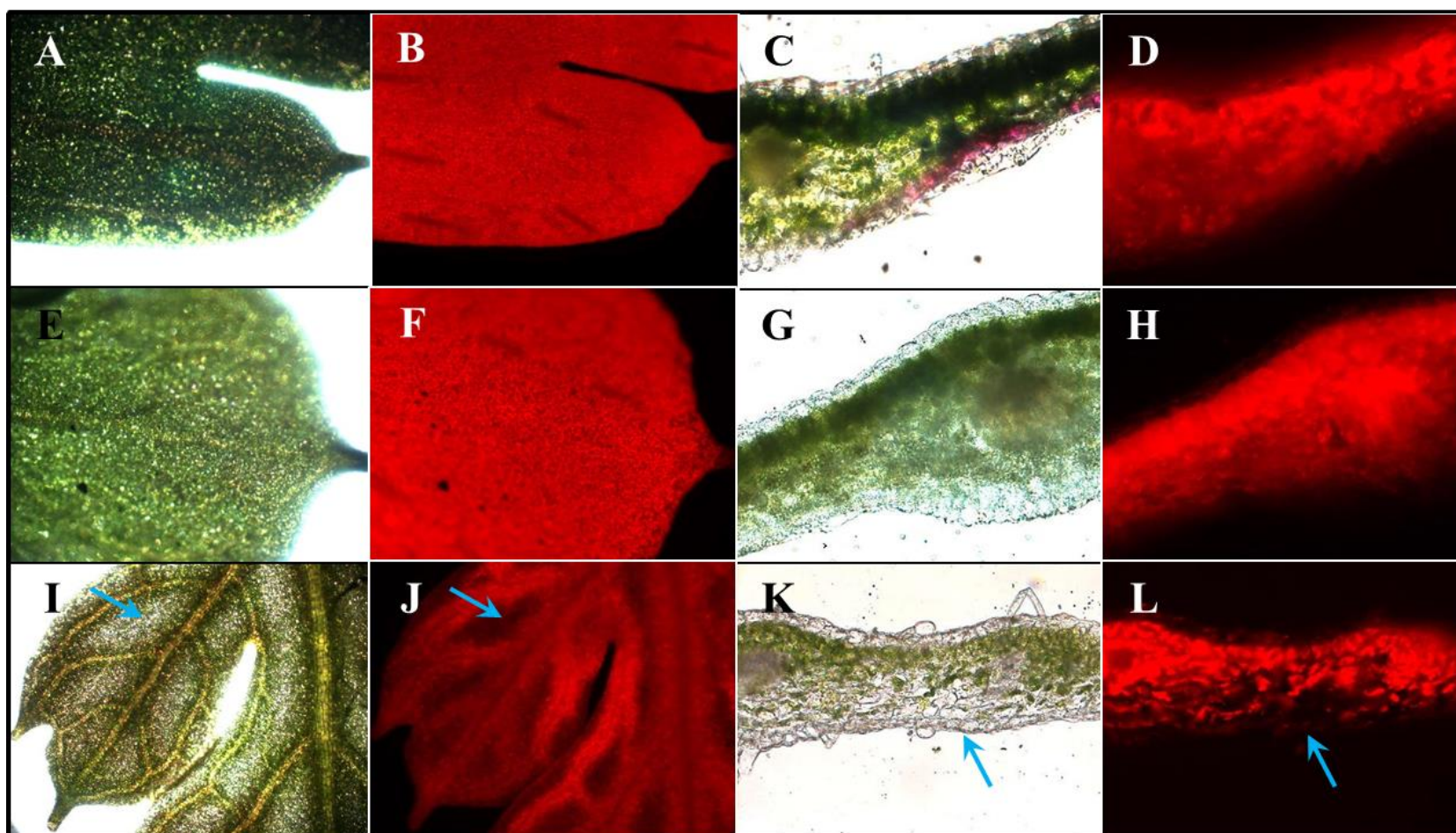


TABLICA XIX. Reakcja roślin *G. robertianum* na herbicydu Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji torowych, w wariantach po oprysku herbicydem. **Oznaczenia na elektronogramach:** CW – ściana komórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; M – mitochondrium; Chl – chloroplast; ziarna skrobi; złogi elektronogęste.

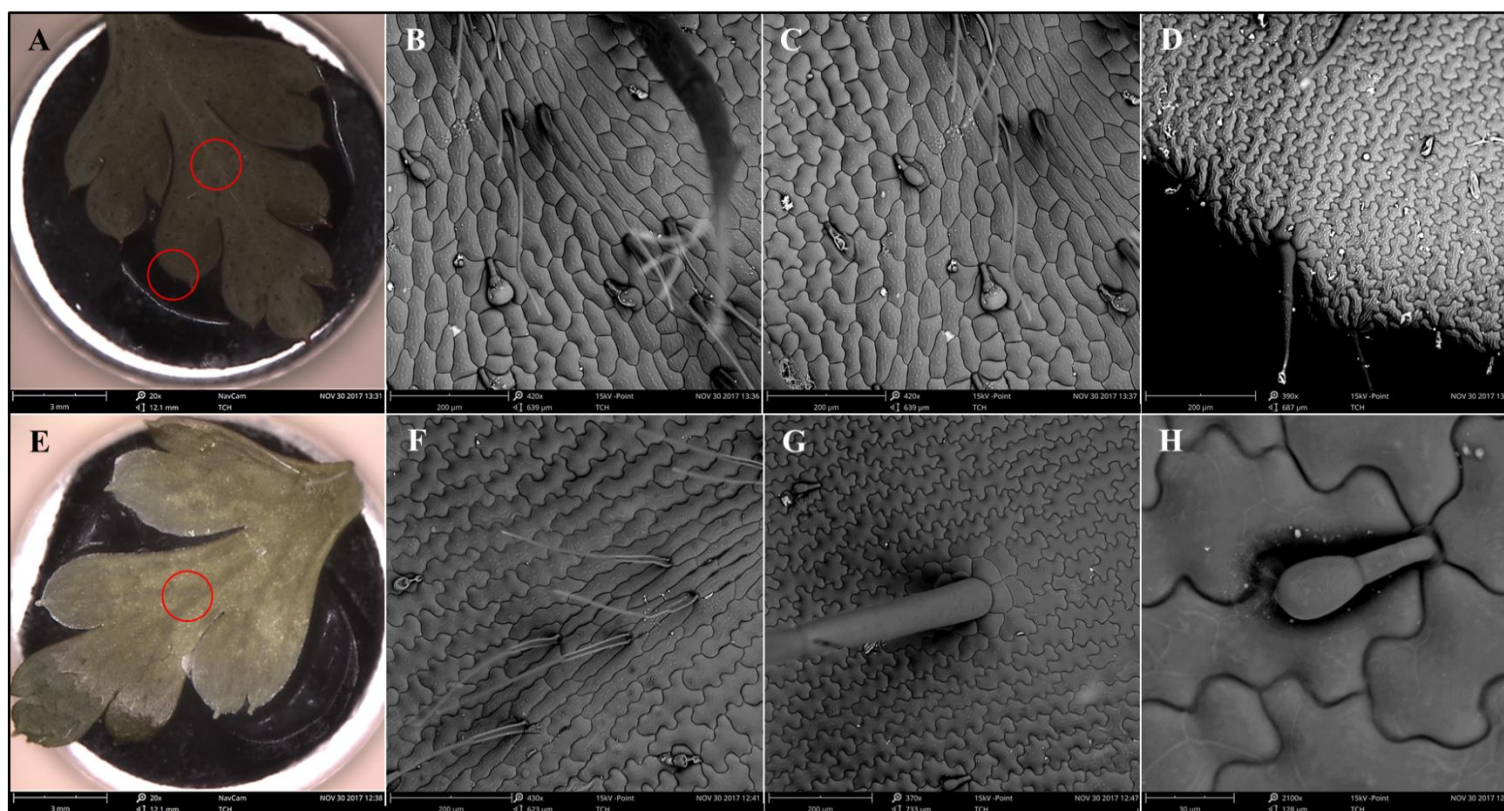
- **60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant K1:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 1 dzień (A).
- **60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant K2:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 8 dni (B).
- **60 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu, wariant K3:** 14 dni od oprysku herbicydem, wiek liścia 15 dni (C).



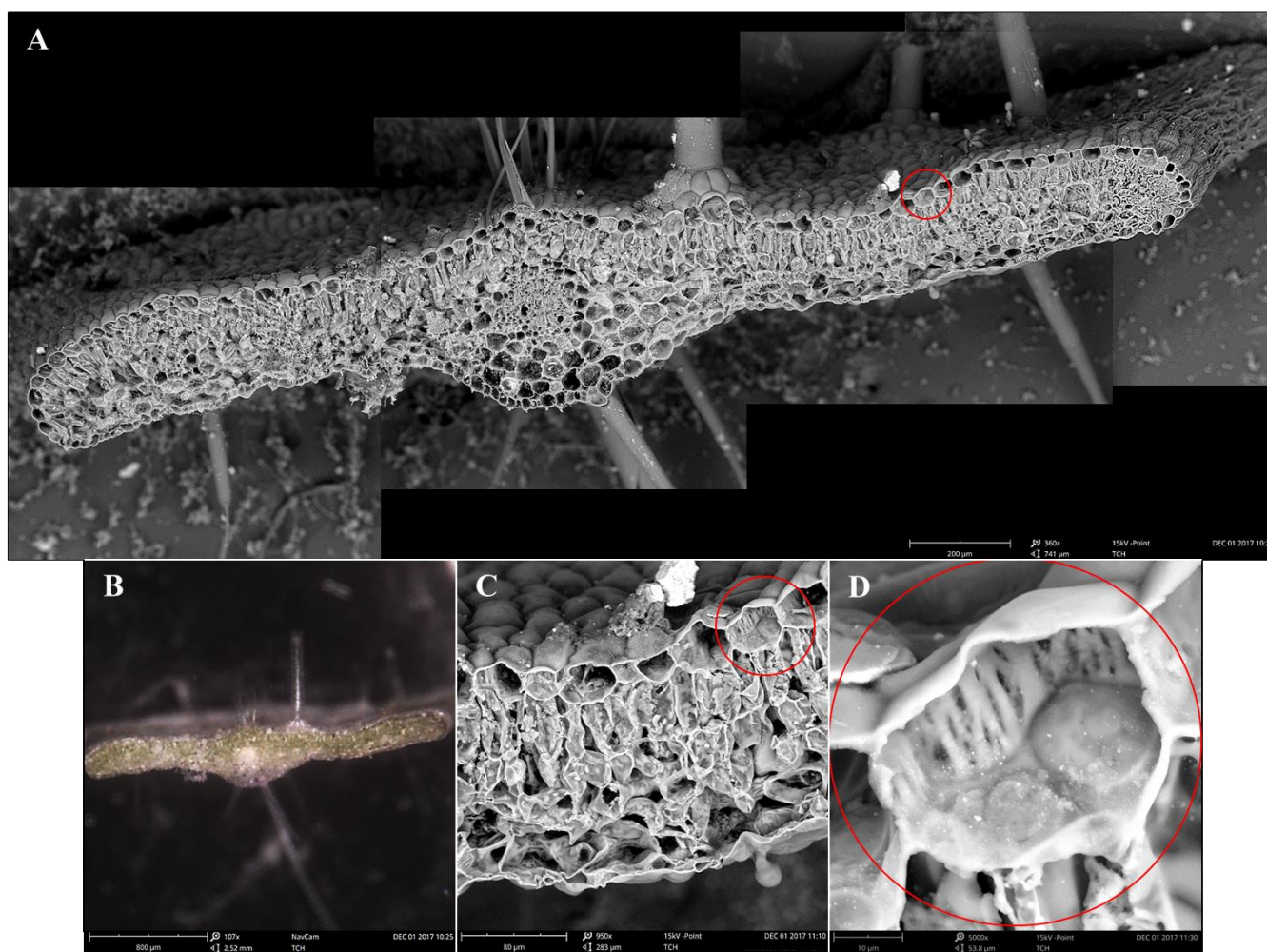
TABLICA XX. Wygląd wybranych roślin *G. robertianum* i ich liści z kontroli i po oprysku herbicydem Roundup (dawka 5-letnia stosowana na torach kolejowych: 7200 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu – 1,5 miesiąca po oprysku herbicydem). Aparat: rośliny *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St (2008) (od lewej) i Zaj-Las (2014) (od prawej) Roundup (A); rośliny *G. robertianum* z populacji torowej BF (2014) po oprysku herbicydem Roundup (B, C). Binokular (pow. 1x, 4x): wierzch i spód blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z kontroli, z populacji Wal-St (2008) (D, H) i Zaj-Las (2014) (E, I); wierzch i spód blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z populacji BF (2013) po oprysku herbicydem Roundup (F, G, J, K).



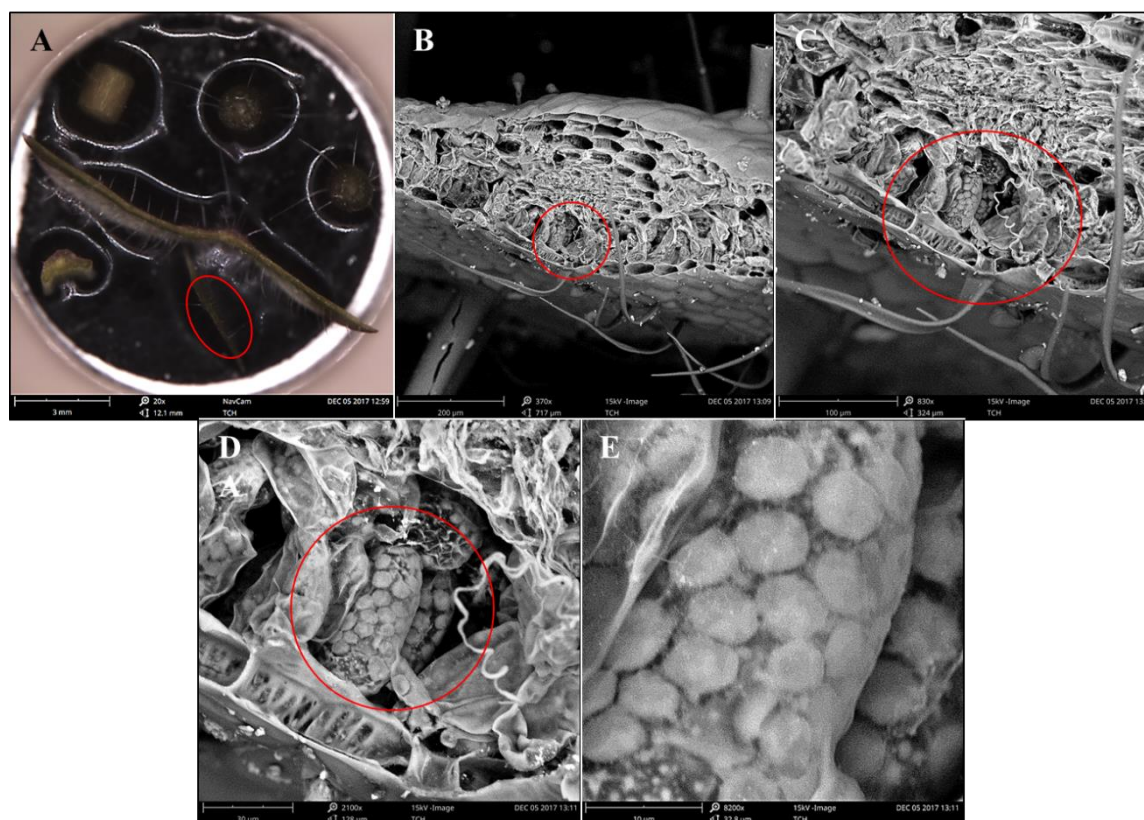
TABLICA XXI. Wygląd blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z kontroli i po oprysku herbicydem Roundup (dawka 5-letnia stosowana na torach kolejowych: 7200 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu – 1,5 miesiąca po oprysku herbicydem). Mikroskop świetlny i fluorescencyjny (pow. 10x, 20x, 40x): wierzch blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z kontroli, z populacji Wal-St (2008) (A, B) i Zaj-Las (2014) (E, F); wierzch blaszek liściowych roślin *G. robertianum* z populacji BF (2013) po oprysku herbicydem Roundup (I, J). Przekroje przez blaszki liściowe roślin *G. robertianum* z kontroli, z populacji torowej Wal-St (2008) (C, D) i z populacji leśnej Zaj-Las (2014) (G, H); przekrój przez blaszkę liściową rośliny *G. robertianum* z populacji torowej BF (2013) po oprysku herbicydem Roundup (K, L). Niebieskimi strzałkami (→) przedstawiono przykładowe miejsca wystąpienia chloroz na liściach.



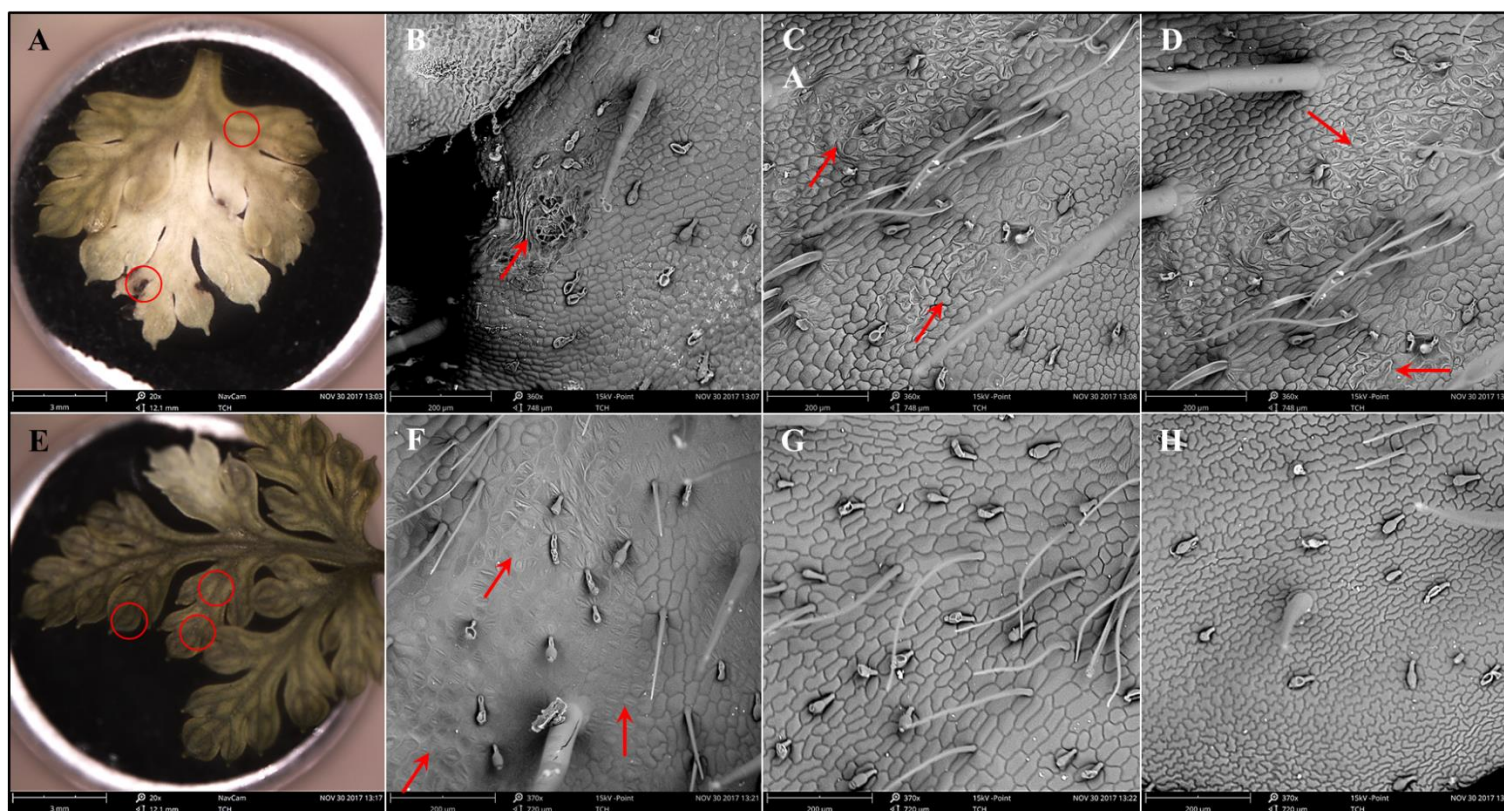
TABLICA XXII. Powierzchnia blaszki liściowej starszych liści z rośliny *G. robertianum* z kontroli, z populacji torowej BF (2013). Mikroskop świetlny (pow. 20x – A, E): wierzch blaszki liściowej (A); SEM (pow.: 420x – B, C; 390x – D; 430x – F; 370x – G; 2100x – H): wierzch blaszki liściowej, włoski na blaszce liściowej (B-D, F-H). Czerwonymi okręgami przedstawiono miejsca szczegółowo oglądane w SEM.



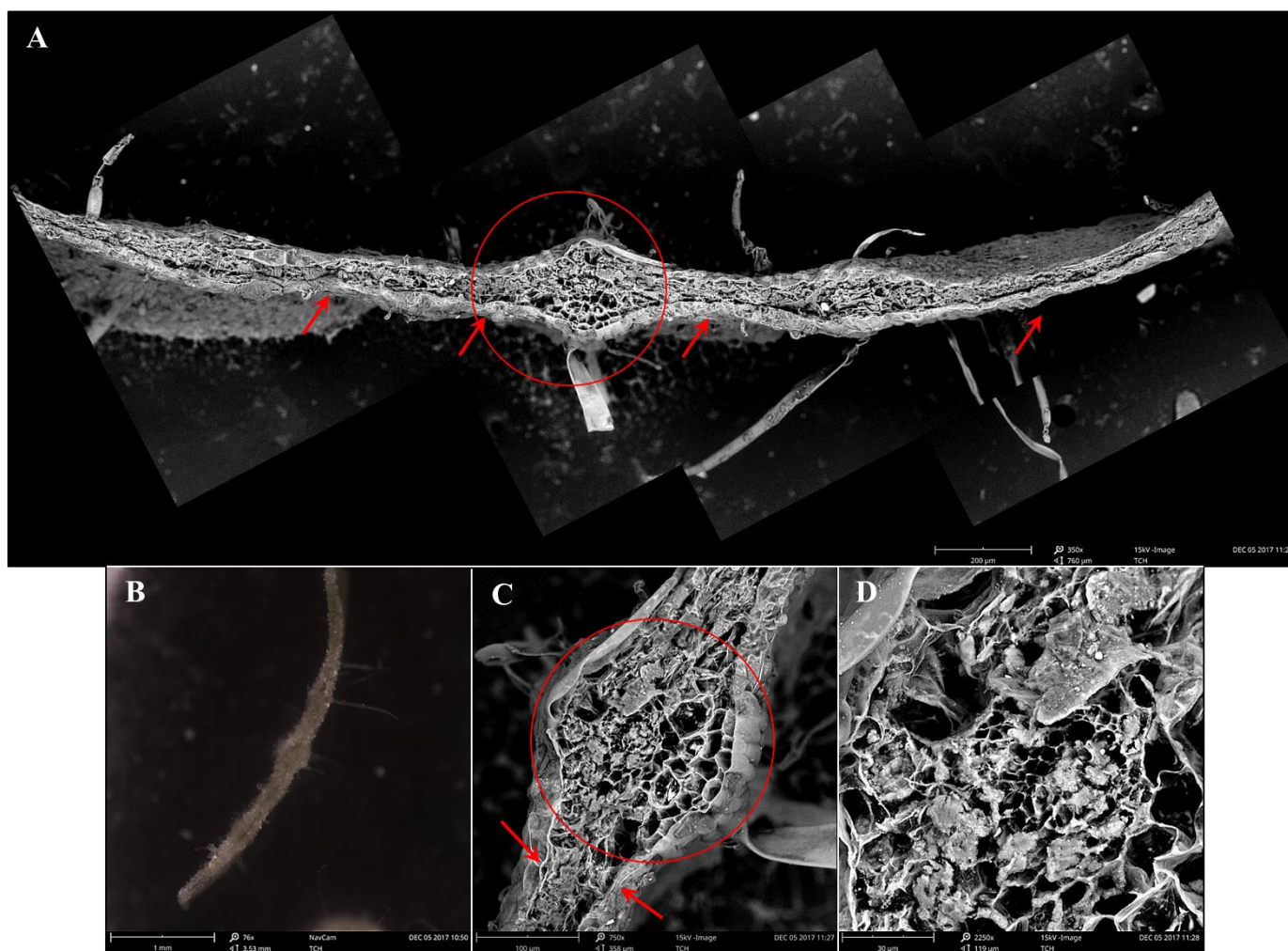
TABLICA XXIII. Przekrój przez blaszkę liściową starszego liścia z rośliny *G. robertianum* z kontroli, z populacji torowej BF (2013). Mikroskop świetlny (pow. 107x): przekrój przez blaszkę liściową, wygląd typowy (B); SEM (pow.: 360x – A; 950x – B; 5000x – C): przekrój przez blaszkę liściową, wygląd prawidłowy (A), wewnątrz komórki epidermy górnej (C, D). Czerwonymi okręgami przedstawiono miejsca szczegółowo oglądane w SEM.



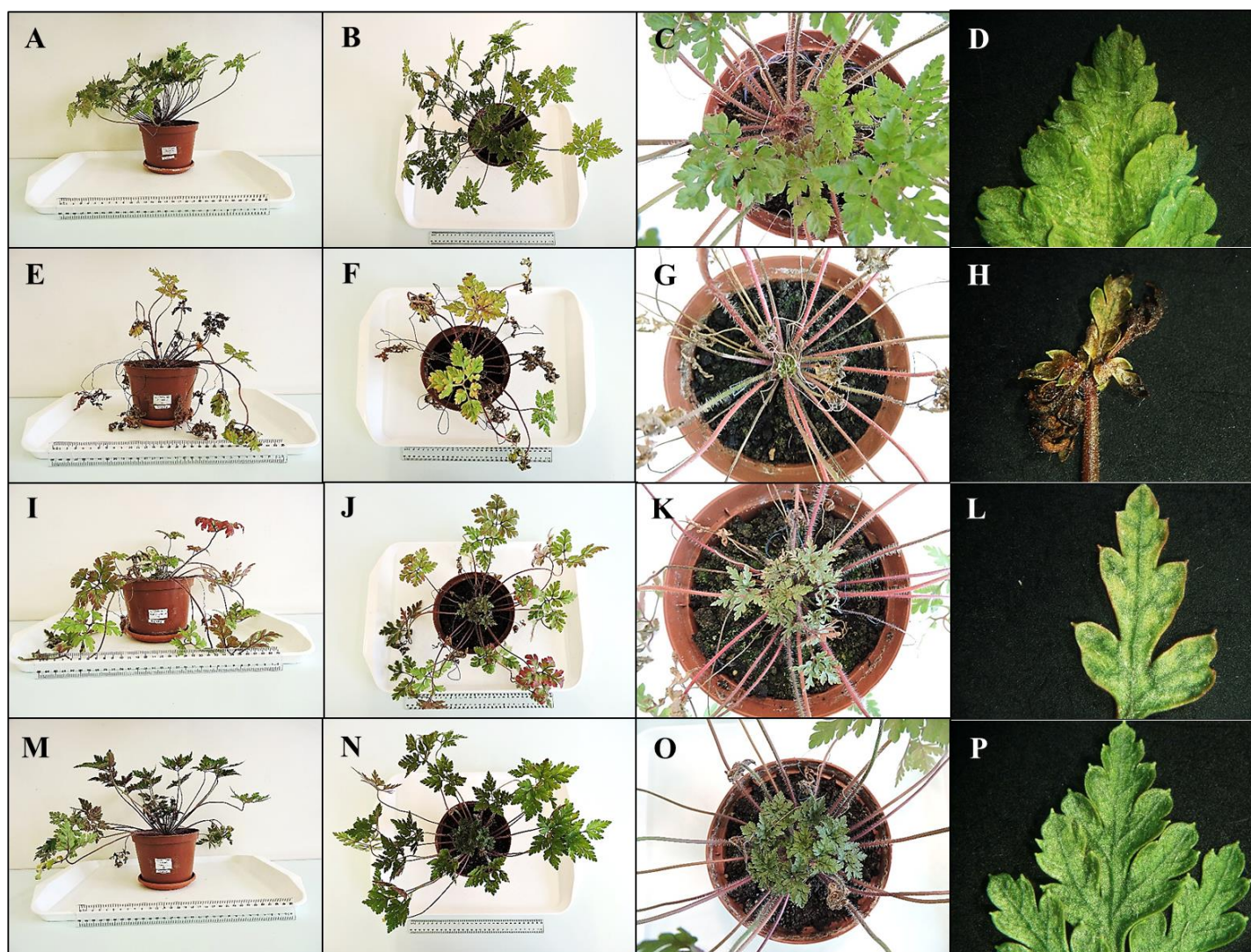
TABLICA XXIV. Przekrój przez blaszkę liściową młodszego liścia z rośliny *G. robertianum* z kontroli, z populacji torowej BF (2013). Mikroskop świetlny (pow. 20x – A): przekrój przez blaszkę liściową, wygląd typowy (A); SEM (pow.: 370x – B; 830x – C; 2100x – D; 8200x – E): przekrój przez blaszkę liściową, wygląd prawidłowy (B); komórki miększu palisadowego z chloroplastami (C-E). Czerwonymi okręgami przedstawiono miejsca szczegółowo oglądane w SEM.



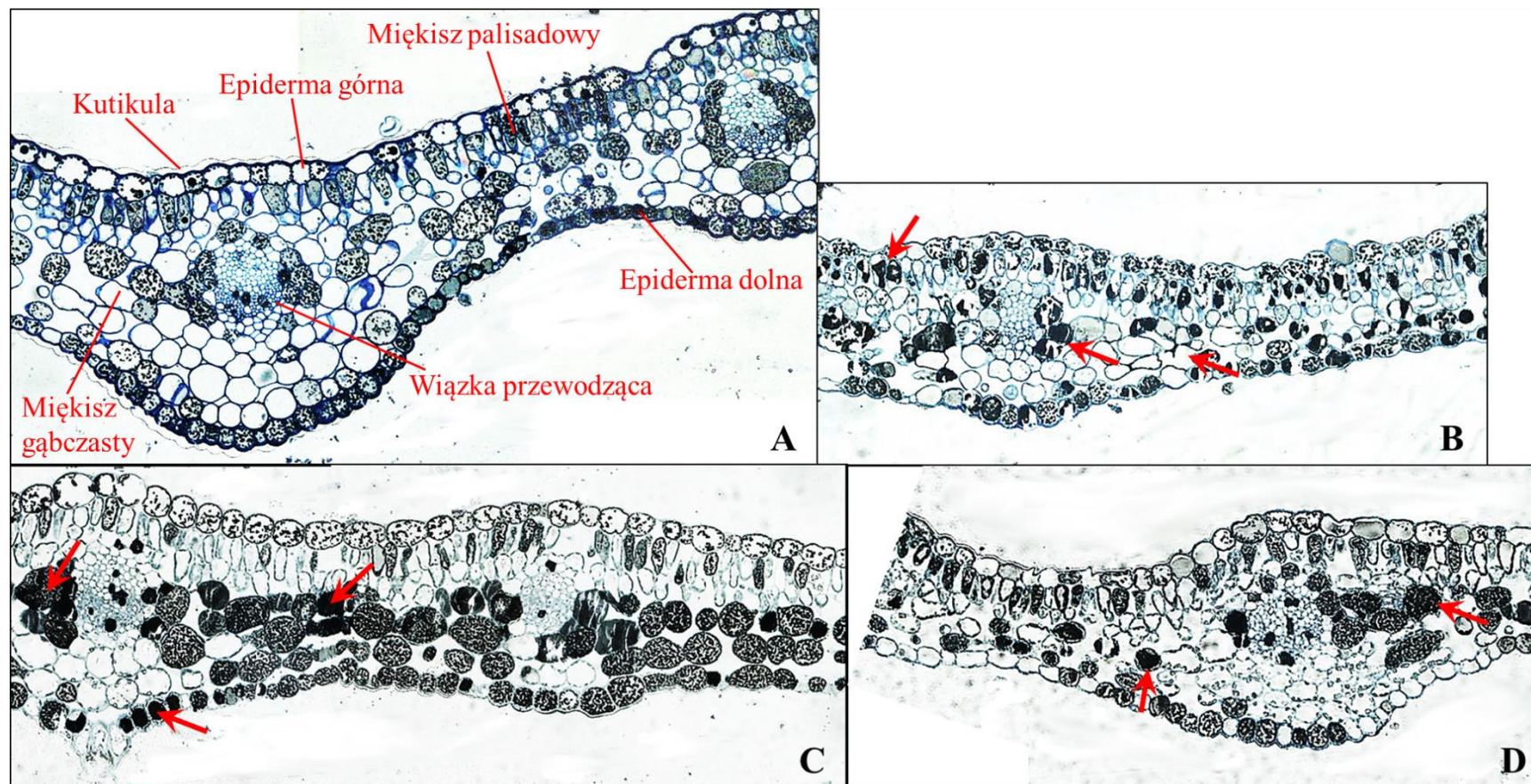
TABLICA XXV. Powierzchnia blaszki liściowej młodszych liści z rośliny *G. robertianum* po oprysku herbicydem Roundup (dawka 5-letnia stosowana na torach kolejowych: 7200 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu – 2 miesiące po oprysku herbicydem), z populacji torowej BF (2013). Mikroskop świetlny (pow. 20x): wierzch blaszki liściowej (A, E); SEM (pow.: 360x – B-D; 370x – F-H): wierzch blaszki liściowej, włoski na blaszce liściowej (B-D, F-H). Czerwonymi okręgami przedstawiono miejsca szczegółowo oglądane w SEM. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca występowania chloroz.



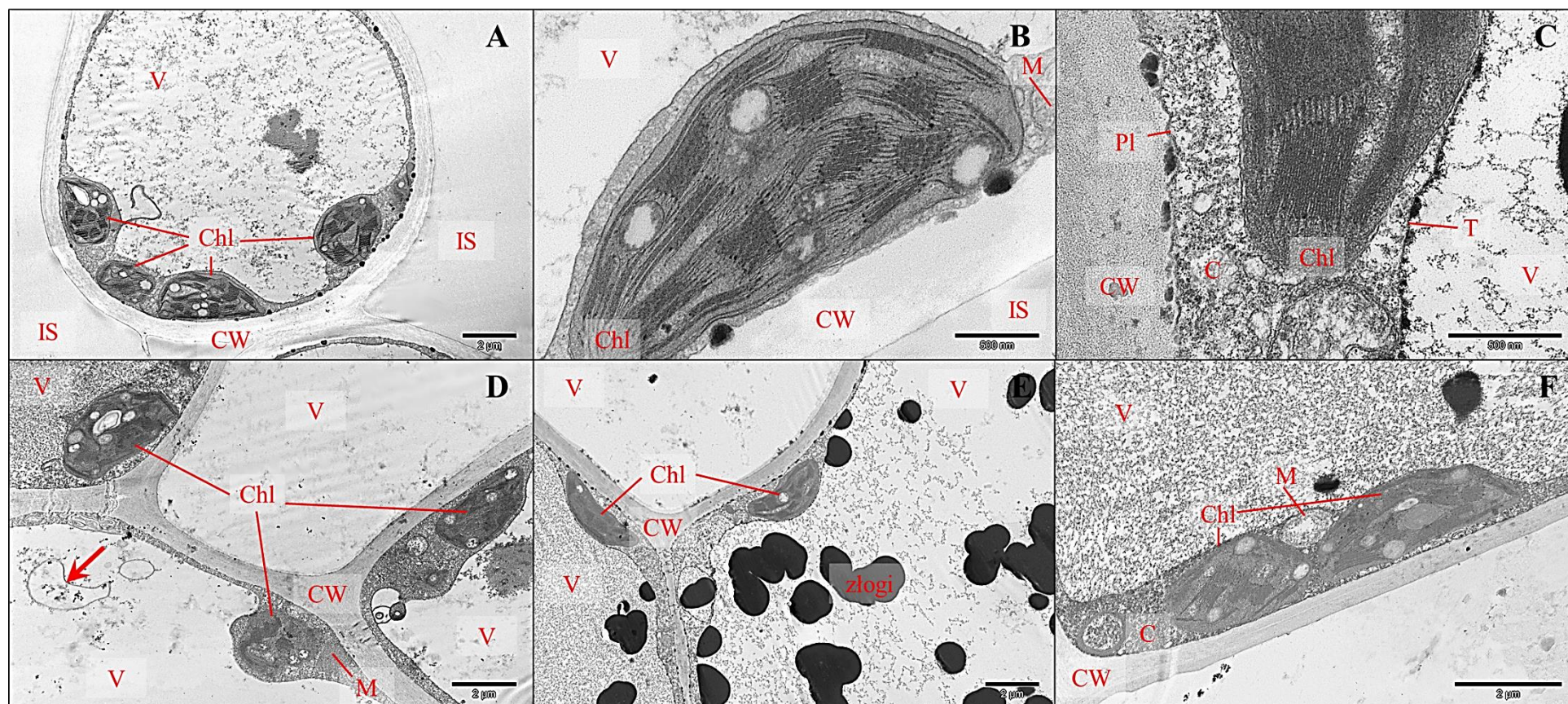
TABLICA XXVI. Przekrój przez blaszkę liściową młodszego liścia z rośliny *G. robertianum* po oprysku herbicydem Roundup (dawka 5-letnia stosowana na torach kolejowych: 7200 mg/l glifosatu, 40 ml roztworu – 2 miesiące po oprysku herbicydem), z populacji torowej BF (2013). Mikroskop świetlny (pow. 76x): przekrój przez blaszkę liściową, blaszka obkurczona (B); SEM (pow.: 350x – A; 750x – C; 2250x – D): przekrój przez blaszkę liściową, komórki miększu obkurczone (A); widok na główną wiązkę przewodzącą (C, D). Czerwonymi okręgami przedstawiono miejsca szczegółowo oglądane w SEM. Czerwonymi strzałkami oznaczono miejsca występowania chloroz.



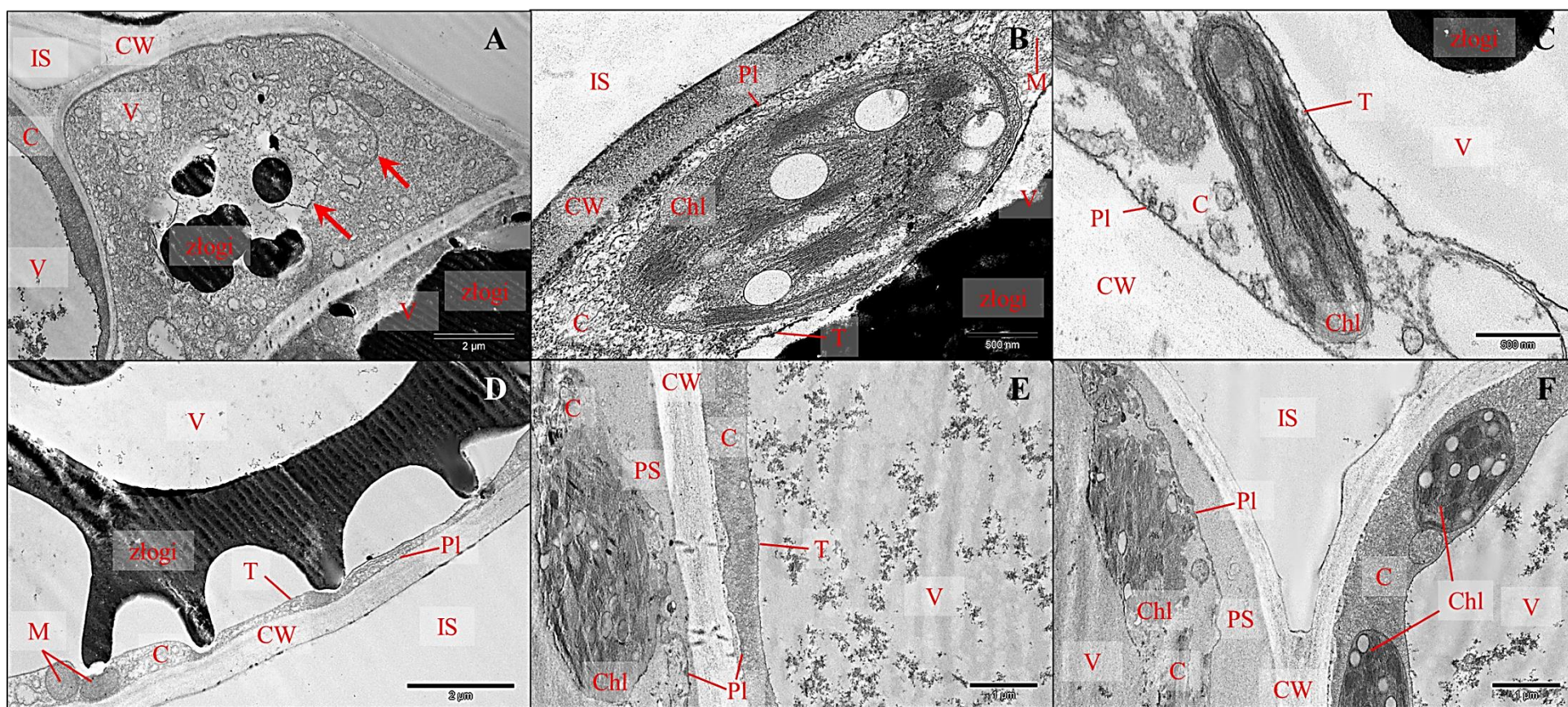
TABLICA XXVII. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. Aparat i binokular (pow. 1x). Roślina *G. robertianum* i blaszki liściowe jej najmłodszych liści z: kontroli – populacja leśna Zaj-Las (2014) (A-D). Rośliny *G. robertianum* i blaszki liściowe ich najmłodszych liści dwa miesiące od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę), z: populacji leśnej Zaj-Las (2014) (E-H), populacji torowych Wal-St-rampa (2015/16) (I-L) i BF (2013) (M-P).



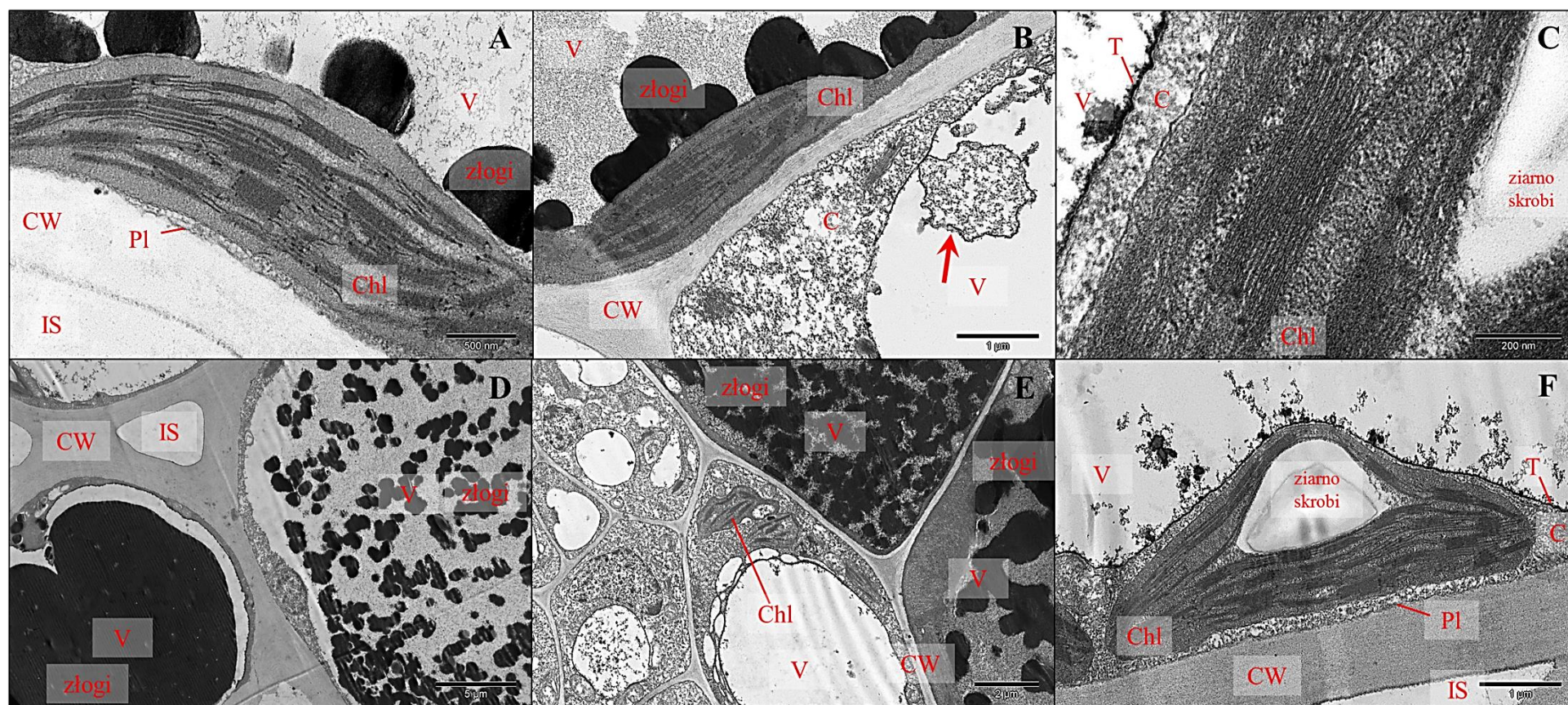
TABLICA XXVIII. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. Mikroskop świetlny, powiększenie: 10x. Przekroje przez blaszki liściowe młodych liści roślin *G. robertianum* z: kontroli – populacja leśna Zaj-Las (2014) (A). Przekroje przez blaszki liściowe młodych liści roślin *G. robertianum* po miesiącu od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę) z: populacji leśnej Zaj-Las (2014) (B), populacji torowych Wal-St-rampa (2015/16) (C) i BF (2013) (D). Strzałkami oznaczono nagromadzenia w wybranych komórkach ciemnych złogów i charakterystycznych „szarości” oraz uszkodzone, skurczone komórki mięszku gąbczastego.



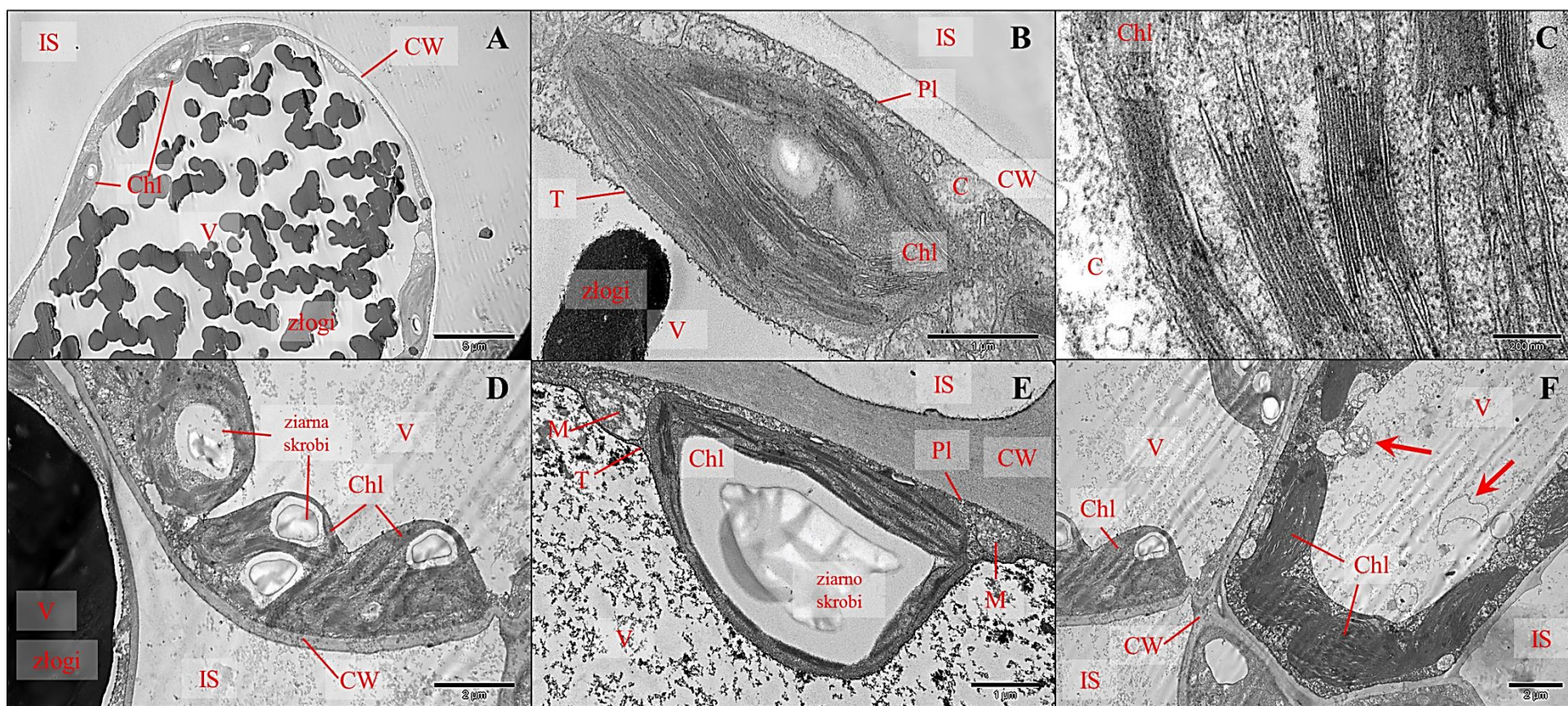
TABLICA XXIX. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji leśnej Zaj-Las (2014) w wariancie kontrolnym: pow. 5000x – miękisz gąbczasty, ultrastruktura typowa, chloroplasty z ziarnami skrobi i bez ziaren skrobi (A); pow. 60 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast bez ziaren skrobi, ultrastruktura typowa (B); pow. 80 000x – miękisz gąbczasty, fragment chloroplastu i cytoplazma, ultrastruktura typowa (C); pow. 12 000x – miękisz gąbczasty, chloroplasty z ziarnami skrobi i bez ziaren skrobi, w wakuoli dodatkowe przedziały błonowe (D); pow. 10 000x – miękisz palisadowy, chloroplasty bez ziaren skrobi, elektronogęste złoże w wakuoli oraz szara kłaczkowata zawartość (E); pow. 20 000x – epiderma dolna, chloroplasty bez ziaren skrobi, kłaczkowata zawartość w wakuoli (F). **Oznaczenia na elektronogramach:** CW – ściana komórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; M – mitochondrium; Chl – chloroplast; IS – przestwór międzykomórkowy; T – tonoplast; Pl – błona komórkowa; ziarna skrobi; złoże elektronogęste. Strzałką oznaczono dodatkowe przedziały w wakuoli.



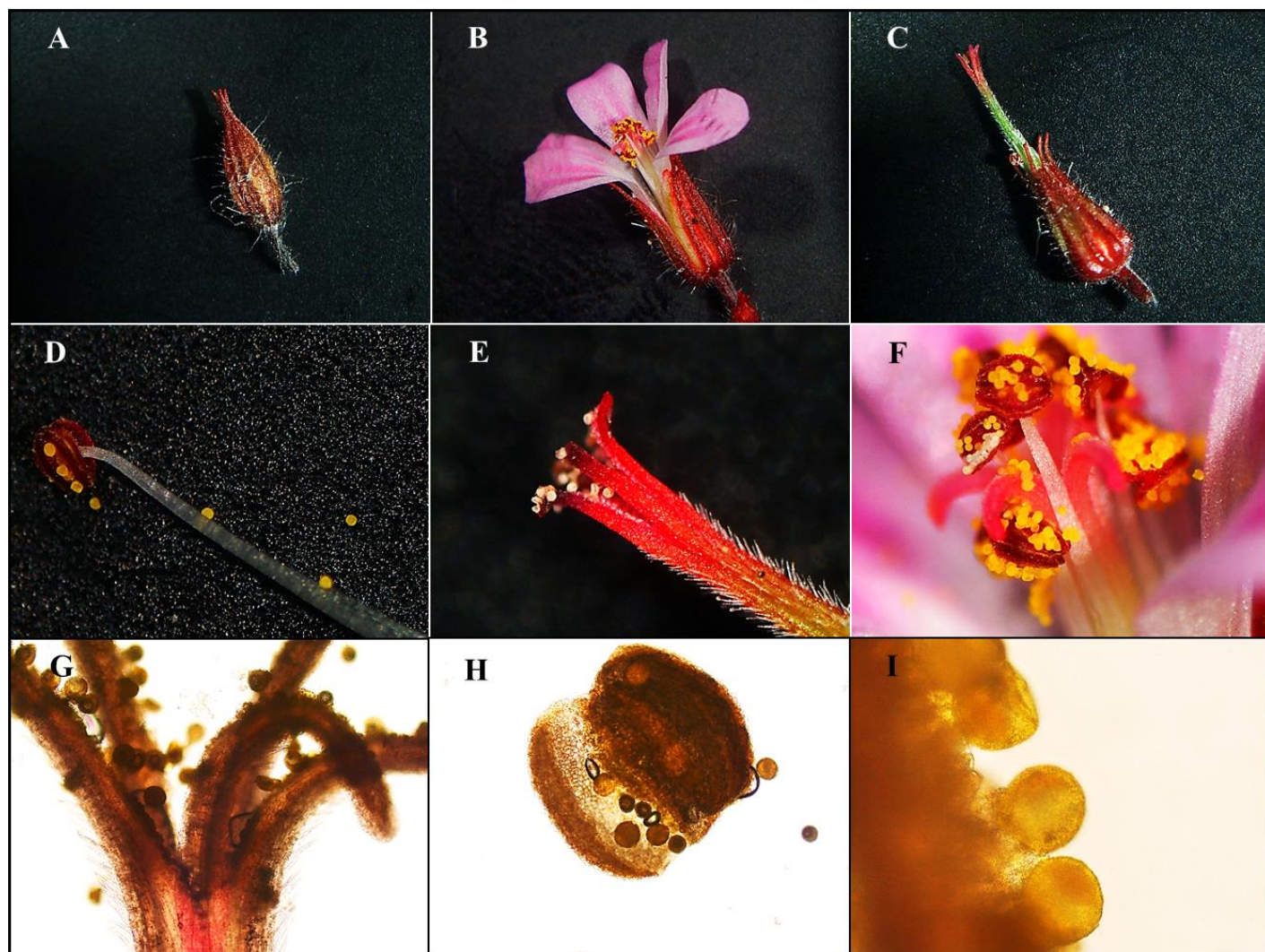
TABLICA XXX. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji leśnej Zaj-Las (2014) w wariancie po miesiącu od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę): pow. 15 000x – komórki epidermy dolnej, wakuole z elektronogęstymi złoгами, kłaczkowatą zawartością oraz dodatkowymi przedziałami (A); pow. 50 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast bez ziaren skrobi, elektronogęste złogi wakuoli (B); pow. 60 000x – miękisz palisadowy, spłaszczony chloroplast u zaburzonej ultrastrukturze, cytoplazma o zaburzonej strukturze, elektronogęste złogi w wakuoli (C); pow. 20 000x – miękisz palisadowy, w wakuoli elektronogęste złogi o charakterystycznym kształcie (D); pow. 25 000x – miękisz palisadowy, rozpadający się chloroplast o zaburzonej ultrastrukturze, uszkodzona błona komórkowa, cytoplazma o zaburzonej strukturze, widoczna przestrzeń periplazmatyczna, plazmoliza (E); pow. 25 000x – miękisz palisadowy, rozpadający się chloroplast o zaburzonej ultrastrukturze, cytoplazma o zaburzonej strukturze, widoczna przestrzeń periplazmatyczna, plazmoliza, chloroplasty bez ziaren skrobi (F). **Oznaczenia na elektronogramach:** CW – ściana komórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; M – mitochondrium; PS – przestrzeń periplazmatyczna, przy plazmolizie; Chl – chloroplast; IS – przestwór międzykomórkowy; T – tonoplast; Pl – błona komórkowa; ziarna skrobi; złogi elektronogęste. Strzałkami oznaczono dodatkowe przedziały w wakuoli.



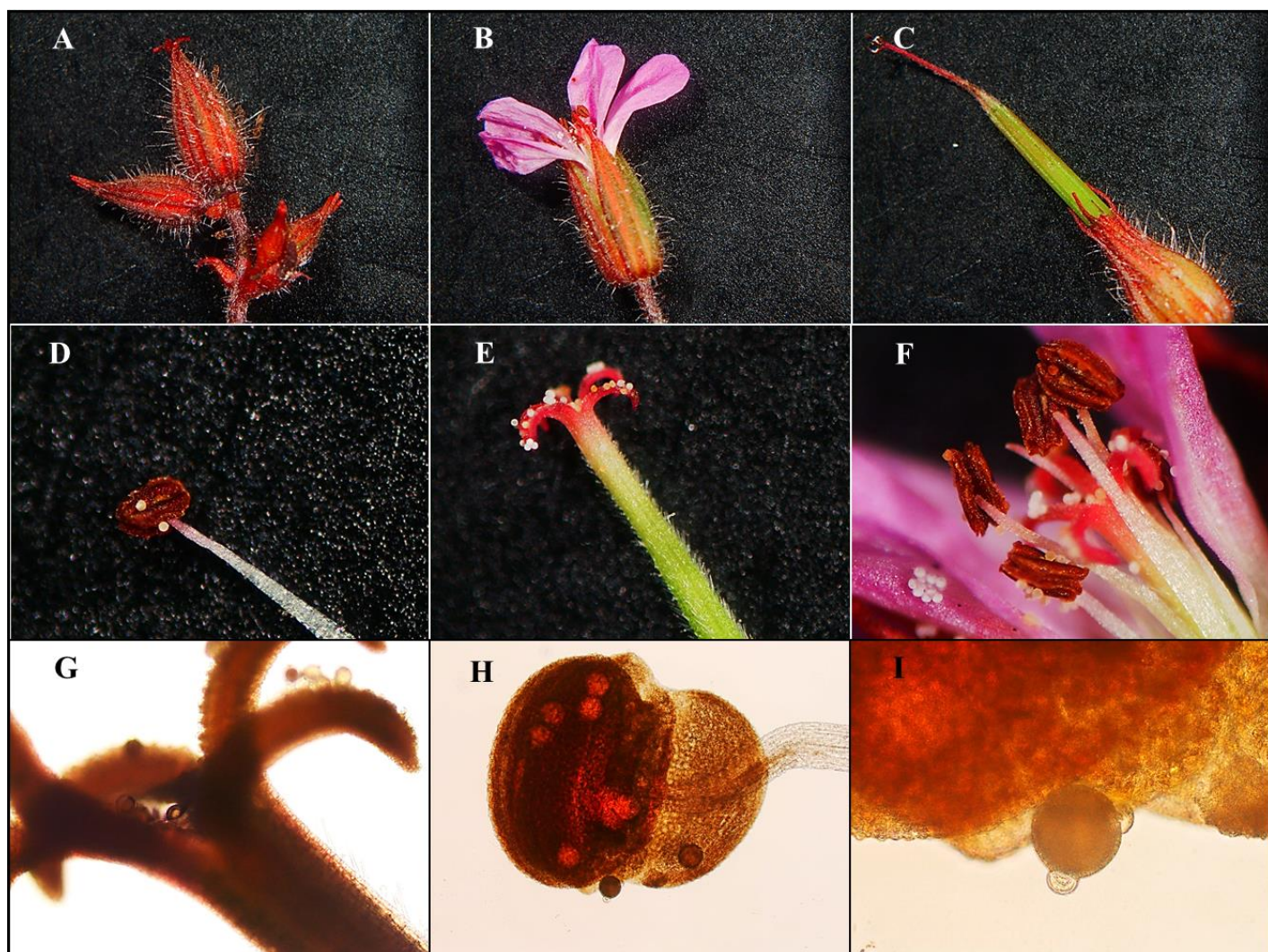
TABLICA XXXI. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St-rampa (2015/16) w wariantach po miesiącu od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę): pow. 50 000x – miękisz palisadowy, chloroplast bez ziaren skrobi o typowej ultrastrukturze, wakuola z elektronogęstymi złoгами i kłaczkową zawartością (A); pow. 30 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast bez ziaren skrobi, elektronogęste złogi i kłaczkowa zawartość w wakuoli, dodatkowe przedziały w wakuoli (B); pow. 150 000x – miękisz gąbczasty, fragment chloroplastu z ziarnem skrobi o typowej ultrastrukturze, cytoplazma o typowej strukturze (C); pow. 60 000x – miękisz gąbczasty, elektronogęste złogi i kłaczkowa zawartość w wakuolach (D); pow. 12 000x – miękisz gąbczasty przy wiązce przewodzącej, elektronogęste złogi i kłaczkowa zawartość w wakuolach (E); pow. 30 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast z dużym ziarnem skrobi o typowej ultrastrukturze (F). **Oznaczenia na elektronogramach:** CW – ściana komórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; Chl – chloroplast; IS – przestwór międzykomórkowy; T – tonoplast; PI – błona komórkowa; ziarna skrobi; złogi elektronogęste. Strzałką oznaczono dodatkowe przedziały w wakuoli.



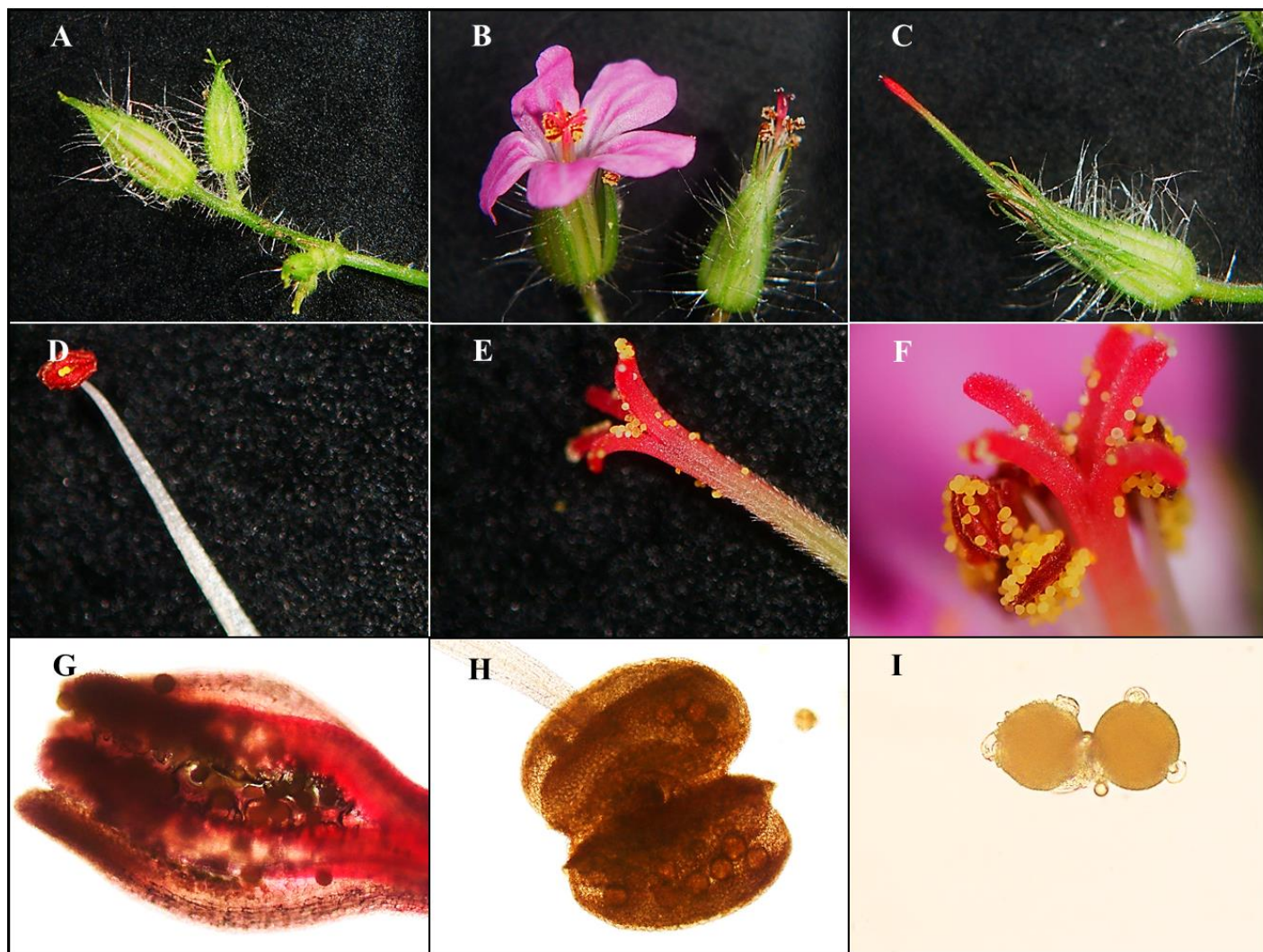
TABLICA XXXII. Doświadczenie porównujące odporność roślin *G. robertianum* z populacji torowych i leśnych na herbicyd Roundup. TEM, ultrastruktura komórek liści roślin *G. robertianum* z populacji torowej BF (2013) w wariantach po miesiącu od oprysku herbicydem Roundup (jednorazowa dawka stosowana na torach kolejowych: 720 mg/l glifosatu, 25 ml roztworu na roślinę): pow. 6000x – miękisz gąbczasty, chloroplasty z ziarnami skrobi i bez ziaren skrobi, wakuola z elektronogęstymi złoгами (A); pow. 40 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast z małym ziarnem skrobi, elektronogęste złogi w wakuoli (B); pow. 120 000x – miękisz gąbczasty przy wiązce przewodzącej, fragment chloroplastu o typowej ultrastrukturze, cytoplazma o typowej strukturze (C); pow. 15 000x – miękisz gąbczasty przy wiązce przewodzącej, chloroplasty z dużymi ziarnami skrobi, elektronogęste złogi i kłaczkowata zawartość w wakuolach (D); pow. 25 000x – miękisz gąbczasty, chloroplast z bardzo dużym ziarnem skrobi, kłaczkowata zawartość w wakuoli (E); pow. 10 000x – miękisz gąbczasty, chloroplasty z ziarnem skrobi i bez ziaren skrobi, dodatkowe przedziały w wakuoli i kłaczkowata zawartość w wakuolach (F). **Oznaczenia na elektronogramach:** CW – ściana komórkowa; C – cytoplazma; V – wakuola; M – mitochondrium; Chl – chloroplast; IS – przestwór międzykomórkowy; T – tonoplast; PI – błona komórkowa; ziarna skrobi; złogi elektronogęste. Strzałkami oznaczono dodatkowe przedziały w wakuoli.



TABLICA XXXIII. Pąk, kwiat (wraz z poszczególnymi elementami) i tworząca się rozłupka z roślin kontrolnych *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St-rampa (2015), wybrane zdjęcia spod binokularu i mikroskopu świetlnego. Binokular: pąk, pow. 1,5x (A); kwiat, pow. 1,5x (B); tworząca się rozłupka, pow. 1,5x (C); pręcik i pyłek, pow. 4x (D); znamię słupka i pyłek, pow. 4x (E); znamię słupka, pręciki i pyłek, pow. 6x (F). Mikroskop: znamię słupka i pyłek, pow. 10x (G); główka pręcika i pyłek, pow. 10x (H); pyłek na znamieniu słupka, pow. 40x (I).



TABLICA XXXIV. Pąk, kwiat (wraz z poszczególnymi elementami) i tworząca się rozłupka z roślin kontrolnych *G. robertianum* z populacji torowej Wal-St-napis (2015), wybrane zdjęcia spod binokularu i mikroskopu świetlnego. Binokular: pąki, pow. 1,5x (A); kwiat, pow. 1,5x (B); tworząca się rozłupka, pow. 1,5x (C); pręcik i pyłek, pow. 4x (D); znamię słupka i pyłek, pow. 4x (E); znamię słupka, pręciki i pyłek, pow. 6x (F). Mikroskop: znamię słupka i pyłek, pow. 10x (G); główka pręcika i pyłek, pow. 10x (H); pyłek na pręciku, pow. 40x (I).



TABLICA XXXV. Pąk, kwiat (wraz z poszczególnymi elementami) i tworząca się rozłupka z roślin kontrolnych *G. robertianum* z populacji leśnej Zaj-Las (2015), wybrane zdjęcia spod binokularu i mikroskopu świetlnego. Binokular: pąki, pow. 1,5x (A); kwiat, pow. 1,5x (B); tworząca się rozłupka, pow. 1,5x (C); pręcik i pyłek, pow. 4x (D); znamię słupka i pyłek, pow. 4x (E); znamię słupka, pręciki i pyłek, pow. 6x (F). Mikroskop: znamię słupka i pyłek, pow. 10x (G); główka pręcika i pyłek, pow. 10x (H); pyłek, pow. 40x (I).